

N° d'enregistrement

au C.N.R.S.

A.O. 5733

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES

de PARIS

par

Monsieur PHAN HOANG HUAN

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse: INFLUENCE DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE SUR L'ABSORPTION
INTESTINALE DU GLUCOSE ET SON DEVENIR CHEZ LE RAT

soutenue le 7 Mai 1971

devant la Commission d'Examen

Mlle E. LE BRETON Président

Mr M. PASCAUD Examineurs

Mme C. GULAT-MARNAY

Mr LE VAN HUNG

Mlle A. JACOB

N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
A.O. 5733

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES

de PARIS

par

Monsieur PHAN HOANG HUAN

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse: INFLUENCE DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE SUR L'ABSORPTION
INTESTINALE DU GLUCOSE ET SON DEVENIR CHEZ LE RAT

soutenue le 7 Mai 1971

devant la Commission d'Examen

Mlle E. LE BRETON	Président
Mr M. PASCAUD	Examineurs
Mme C. GULAT-MARNAY	
Mr LE VAN HUNG	
Mlle A. JACOB	



Mademoiselle E. LE BRETON

Professeur Honoraire à la Faculté des Sciences de Paris

Directeur Honoraire du Centre de Recherche sur la Cellule Normale
et Cancéreuse du C.N.R.S.

nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Nous lui sommes profondément reconnaissant de l'intérêt qu'elle n'a cessé de manifester à nos recherches, du temps qu'elle a passé à en discuter les résultats et de l'échange d'idées dont elle nous a fait bénéficier. Nous avons trouvé auprès d'elle une très grande et généreuse compréhension.

Qu'elle veuille bien accepter l'assurance de notre profonde reconnaissance et de notre respectueux attachement.

Monsieur M. PASCAUD

Professeur à la Faculté des Sciences de Paris

nous a fait l'honneur d'accepter d'être de notre jury.

Il a toujours facilité nos recherches. C'est dans le Laboratoire de Physiologie de la Nutrition qu'il dirige que ce travail a été réalisé.

Nous le remercions de sa bienveillante sollicitude et lui exprimons ici toute notre reconnaissance.

Madame C. GULAT-MARNAY

Maître de Recherche au Centre National de la Recherche Scientifique
assume depuis toujours notre parrainage au C.N.R.S.. Elle a suivi nos recherches,
en a discuté certains aspects; ses conseils nous ont été précieux.

Nous la remercions particulièrement d'avoir bien voulu accepter d'être
le rapporteur de ce travail.

Qu'elle trouve ici le témoignage de nos sentiments de respectueuse
reconnaissance .

Monsieur LE VAN HUNG

Maître de Recherche au Centre National de la Recherche Scientifique
a été notre Directeur de Recherche au C.N.R.S. . Nous lui devons notre
initiation à la Recherche . Il nous a inspiré le sujet de cette thèse et
prodigué inlassablement ses conseils tout au long de sa réalisation . Nous
avons trouvé auprès de lui un accueil qui nous a touché car il était
l'expression de ce sens de l'humain que tous ceux qui l'entourent ressentent .

Avec notre vive gratitude nous voudrions lui exprimer ici notre profond
et affectueux attachement .

Mademoiselle A. JACOB

Maître-Assistant à la Faculté des Sciences à Paris, Docteur ès Sciences
a toujours manifesté de l'intérêt pour nos recherches . Sa compétence dans le
domaine du métabolisme des glucides, nous a permis d'avoir avec elle
d'intéressantes discussions . Sa présence dans ce jury nous est précieuse .

Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse
gratitude .

L'aide que nous avons trouvée auprès de Monsieur QUAN PHUC CANH nous a permis de réaliser certaines expériences. Par ailleurs, son concours pour la réalisation matérielle de cette thèse a été très efficace.

Qu'il soit remercié très amicalement.

Nous adressons aussi nos remerciements à tous nos camarades de laboratoire pour leur intérêt porté à notre travail et spécialement à Mademoiselle M. MAINGOURD pour sa participation expérimentale au dosage de l'acide pantothénique.

INFLUENCE DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE SUR L'ABSORPTION INTESTINALE
DU GLUCOSE ET SON DEVENIR CHEZ LE RAT

Plan

	<u>Pages</u>
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>ETAT ACTUEL DU SUJET</u>	2
I - LES METHODES D'ETUDES DE L'ABSORPTION INTESTINALE	2
II- LES PROBLEMES ABORDES DANS LES ETUDES D'ABSORPTION INTESTINALE DU GLUCOSE	6
<u>PARTIE TECHNIQUE</u>	
- DOSAGES DU GLUCOSE	14
- DOSAGE DU GLYCOGENE	17
- DOSAGE DU CoA	19
- DOSAGE DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE	22
- DETERMINATION DE L'ACTIVITE DE LA GLYCOGENE SYNTHETASE	24
- REMARQUES CONCERNANT LE MATERIEL ANIMAL ET LE CALCUL STATISTIQUE	27
<u>PREMIERE PARTIE</u>	
<u>INFLUENCE DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE SUR L'ABSORPTION INTES-</u> <u>TINALE DU GLUCOSE</u>	28
<u>CHAPITRE I : METHODES D'ETUDES</u>	29
I - OBTENTION DES DIVERS TYPES D'ANSE DE THIRY-VELLA SUR LE RAT	29
II- DESCRIPTION D'UN PROTOCOLE TYPE DE PERFUSION	41

	<u>Pages</u>
<u>CHAPITRE II : EFFET DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE SUR L'ABSORPTION</u> DU GLUCOSE	43
I - EXPRESSION DES RESULTATS	43
II- SIMILITUDE DE L'ABSORPTION PAR DES ANSES DE THIRY- VELLA "TEMPORAIRE" ET "PERMANENTE"	43
III- DETERMINATION DE LA DOSE D'ACIDE PANTOTHENIQUE	45
<u>CHAPITRE III : SPECIFICITE DE L'ACTION DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE</u> SUR L'ABSORPTION DU GLUCOSE	52
I - ETUDE COMPAREE DE QUELQUES VITAMINES HYDROSOLUBLES	52
II- CONSTITUANT ET FONCTION DE LA MOLECULE RESPONSABLES DE L'ACTIVITE DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE	57
A - Influence de la β alanine	
B - Influence du panthénol	
<u>CHAPITRE IV : CARACTERISTIQUES DE L'ACTION DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE SUR</u> L'ABSORPTION INTESTINALE DU GLUCOSE	63
I - MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTION LOCALE ET "IN SITU" DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE	63
II- DUREE D'ACTION DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE	68
III-ACTION IMMEDIATE DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE SUR L'ABSORPTION INTESTINALE DU GLUCOSE	71
<u>DEUXIEME PARTIE</u>	77
<u>MECANISME D'ACTION DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE SUR L'ABSORPTION</u> DU GLUCOSE	
<u>CHAPITRE I : ACTION D'UN ANTAGONISTE DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE, LA</u> PANTOYLTAURINE SUR L'ABSORPTION	79
<u>CHAPITRE II: INTERVENTION D'UNE PROTEINE DANS L'ACTION EXERCEE PAR</u> L'ACIDE PANTOTHENIQUE SUR L'ABSORPTION DU GLUCOSE	87

	<u>Pages</u>
<u>CHAPITRE III : FORME DE PARTICIPATION DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE</u> <u>DANS L'ABSORPTION DU GLUCOSE</u>	95
I - ACTION DU COENZYME A A FAIBLE DOSE SUR L'ABSORPTION DU GLUCOSE	95
II - ACTION DU COENZYME A A DOSE ELEVEE SUR L'ABSORPTION DU GLUCOSE	98
III- ACTION DES COMPOSES A GROUPEMENT SULFHYDRYLE SUR L'ABSORPTION DU GLUCOSE	100
<u>CHAPITRE IV : TENEUR DE L'INTESTIN EN COENZYME A ET EN ACIDE</u> <u>PANTOTHENIQUE SELON LA COMPOSITION DU PERFUSAT</u>	105
I - TENEUR EN COENZYME A DANS LA PAROI DE L'ANSE PER- FUSEE	108
II - TENEUR DE LA PAROI INTESTINALE EN ACIDE PANTOTHE- NIQUE	114
<u>TROISIEME PARTIE</u>	118
<u>ACTION DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE ET DU COENZYME A SUR LE</u> <u>DEVENIR DU GLUCOSE APRES SON ABSORPTION</u>	
<u>CHAPITRE I : GLYCEMIE ET ACIDE PANTOTHENIQUE</u>	120
<u>CHAPITRE II: LE GLYCOGENE HEPATIQUE APRES ABSORPTION INTESTINALE</u> DU GLUCOSE EN PRESENCE D'ACIDE PANTOTHENIQUE	126
<u>CHAPITRE III:EFFET "IN VITRO" DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE ET DU COEN-</u> ZYME A SUR L'ACTIVITE DE LA GLYCOGENE SYNTHETASE	134
1 - Détermination des doses de coenzyme A et d'acide pantothenique utilisées .	137

	<u>Pages</u>
2 - Effets activateurs du coenzyme A et de l'acide pantothénique sur la glycogène synthétase en fonction du temps de conservation de l'homogénat	139
3 - Effets du coenzyme A et de l'acide pantothénique sur l'activité de la glycogène synthétase de l'homogénat frais .	141
4 - Spécificité du substrat de la glycogène-synthétase : action du coenzyme A sur cette spécificité	144

<u>CONCLUSION</u>	147
-------------------	-----

<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	150
----------------------	-----

<u>LEXIQUE D'ABREVIATIONS</u>	160
-------------------------------	-----

INTRODUCTION

L'absorption intestinale qui rejoint à l'échelle cellulaire le problème de perméabilité des membranes, a suscité d'innombrables recherches dans le but d'élucider la complexité des mécanismes mis en jeu. Les entérocytes possèdent la double particularité d'être en contact avec des substances d'origine exogène ayant subi des transformations plus ou moins profondes lors de la formation de chyle intestinal aboutissant aux composés de poids moléculaire ^{peu} élevé qui, après absorption, devront satisfaire aux besoins métaboliques de l'organisme, et de transformer certains d'entre eux notamment les glucides (saccharose, lactose, maltose) avant leur passage dans la circulation sanguine. La régulation de ce processus a lieu au niveau de la barrière intestinale qui contrôle le passage des nutriments nécessitant la présence des systèmes de transport actif. Les propriétés des entérocytes incluent non seulement les caractéristiques de la pénétration d'une substance du compartiment muqueux à l'intérieur de ces cellules mais aussi sa diffusion à travers les couches cellulaires jusqu'au compartiment séreux. Cette absorption intestinale met donc en jeu une série complexe d'étapes. En ce qui concerne l'absorption des glucides, sujet de ce travail, un nombre important de recherches a été fait sur le glucose (21, 80, 25, 133) dont l'absorption active pose le problème des différents facteurs capables d'agir sur le transport actif de ce nutriment. Parmi eux, plusieurs sont des inhibiteurs métaboliques intervenant dans des processus enzymatiques (fluorure, dinitrophénol, phloridzine), d'autres relèvent de la pharmacodynamie (digitaline, strophantine, salicylate), d'autres encore concourent au maintien d'un gradient ionique intracellulaire (Na^+ , K^+); Les interrelations des différents nutriments de même que l'influence des carences vitaminiques ont été étudiées sur l'absorption des glucides.

En général, les carences vitaminiques la diminuent mais la supplémentation en vitamines, après une période de carence sélective, engendre des effets différents sur l'absorption des glucides, en particulier du glucose, selon la vitamine étudiée (ALTMAN et coll.) . Ainsi, l'acide pantothénique, administré après un temps suffisant de privation, ne permet qu'une récupération subnormale de la capacité absorptive du glucose chez le rat . Par contre, après leur carence individuelle, la supplémentation de la plupart des autres vitamines du groupe B, augmente très nettement la capacité d'absorption au-dessus du niveau normal si l'acide pantothénique figure constamment dans le régime . Il nous semble fondé d'entrevoir d'après ces intéressantes observations d'ALTMAN et coll. l'intervention possible de l'acide pantothénique sur le mécanisme d'absorption du glucose , une carence prolongée en cette vitamine modifiant partiellement cette absorption .

ETAT ACTUEL DU SUJET

I - LES METHODES D'ETUDES DE L'ABSORPTION INTESTINALE .

Les méthodes utilisées pour l'étude de l'absorption intestinale sont très variées et peuvent se diviser en deux groupes : les méthodes " in vitro " et les méthodes " in vivo " .

Il est indéniable qu'il est important dans les méthodes " in vitro " de maintenir l'intestin en survie au cours de l'expérience . En 1949, FISCHER et PARSONS ont instauré dans ce but la technique de circulation artificielle " in vitro " avec oxygénation adéquate des deux côtés du segment intestinal . L'appareillage approprié à ces expériences a été simplifié et devenu de réalisation facile (133, 31), mais un grand progrès dans les méthodes " in vitro " d'absorption intestinale a été apporté par WILSON et WISEMAN (131) avec la méthode du sac éversé ; des petits segments d'intestin sont retournés, la surface muqueuse se trouve ainsi située vers l'extérieur, l'écartement des villosités est plus grand et permet une meilleure

circulation du liquide d'incubation et une oxygénation plus complète de la muqueuse . Diverses améliorations de détails techniques ont été faites (26, 53) pour faciliter la mise en place et le prélèvement des liquides externe et interne du sac éversé . L'apport technique le plus récent à cette méthode concerne le contrôle du débit liquide et gazeux ainsi que la connaissance précise des volumes de liquide de circulation par un système de pompe multicanale (1969 Rozen) .

Un progrès important avait été réalisé dès 1960 par l'utilisation de fines analyses des substances absorbées et accumulées à l'intérieur de la paroi intestinale au cours de l'absorption par des anneaux du tube intestinal prélevés à divers niveaux.

Cette technique d'accumulation intratissulaire a permis l'utilisation des méthodes histochimiques et radiohistologiques . Sa reproductibilité et son pouvoir de fixer le glucose à une étape déterminée de son absorption ou de son métabolisme ont fourni d'amples informations sur les propriétés de l'épithélium intestinal .

Si ces divers perfectionnements techniques des méthodes "in vitro" ont permis de mettre en évidence les différentes étapes du transport actif du glucose au niveau des entérocytes, il n'en est pas moins vrai qu'on ne saurait considérer cet épithélium de la muqueuse intestinale comme une unité fonctionnelle indépendante ; selon nous, le problème biologique est en fait le sort de tel ou tel métabolite introduit dans une anse ayant conservé ses connexions vasculaires et nerveuses avec l'organisme . Le transport actif du glucose est sous la double dépendance de l'activité des entérocytes et des systèmes de régulation de l'organisme . Ces conditions essentielles seules les méthodes " in vivo " les réalisent parfaitement .

La première méthode " in vivo " qui permettait de procéder à une analyse quantitative de solution introduite dans l'intestin est l'anse de Thiry-Vella réalisée en 1888 (119) . Mais l'animal est sous

anesthésie au cours de l'expérience . Par la méthode "in vivo" de tubage gastrique (21), Cori a pu réaliser des expériences d'absorption chez le rat éveillé . La quantité de glucose introduite dans le tractus gastro intestinal est connue, et au bout d'un temps fixé, on prélève le contenu intestinal non absorbé après sacrifice de l'animal . Ainsi Cori a été le premier à constater la spécificité de l'absorption des sucres . Cependant la motilité gastro intestinale et la longueur de l'intestin sont des facteurs de variation non négligeables de l'absorption dont cet auteur ne peut tenir compte . Pour y remédier, Verzar (120) préconisait d'injecter les solutions de sucre dans des segments intestinaux ligaturés et laissés in situ, le prélèvement d'échantillons à analyser se faisant par ponction . On déduit la vitesse d'absorption par la différence de concentration de ces échantillons en fonction du temps . Il va de soi que cette méthode n'est pas physiologique .

Plus récemment, Solis et Ponz (104) ont repris la méthode Verzar en perfusant le segment intestinal isolé, les bouts intestinaux adjacents à cette anse isolée étant simplement ligaturés et laissés tels quels, la continuité de l'intestin n'a pas été rétablie . L'absorption est évaluée de façon indirecte et globale par différence entre les teneurs en sucre de la solution perfusée avant et après l'expérience . D'autres auteurs ont essayé de préciser la valeur propre de l'absorption en déterminant le coût énergétique dû à ce phénomène par dosage de la concentration d'acide lactique dans la veine cave avant et après la dérivation mésentérique , sans avoir pu obtenir des résultats concluants (8) , c'est ainsi que Kiyasu et Chaikoff en 1956 ont perfectionné ce procédé d'investigation en donnant du glucose marqué au rat puis en récoltant en même temps tout le sang mésentérique drainant la portion intestinale étudiée . Ils déterminaient ensuite par radiochromatographie du sang, de la paroi intestinale, la quantité de glucose absorbé .

L'utilisation des radio isotopes a permis de suivre "in vivo" le devenir et le comportement des molécules de glucose dans l'or-

ganisme (Hawkins et Wills 1957; Taylor et Langdon 1956) et en déduire la forme que présente le glucose au cours de son passage à travers la paroi intestinale .

II - LES PROBLEMES ABORDES DANS LES ETUDES D'ABSORPTION INTESTINALE DU GLUCOSE

Depuis les observations de Hedon (45^{bis}) concernant l'absorption intestinale d'une solution isotonique de glucose, les physiologistes (CORI) ont précisé en se bornant à l'aspect qualitatif de l'absorption du glucose , la vitesse et la spécificité du mécanisme mis en jeu . Afin d'éclairer ce mécanisme particulier, qui rejoint le phénomène plus général de passage à travers les membranes cellulaires, successivement plusieurs hypothèses ont été proposées en relation avec des investigations rendues possibles par diverses améliorations techniques . La complexité et la difficulté des études sur le tissu intestinal réside dans le grand nombre d'enzymes présentes, difficiles à isoler sur une quantité relativement restreinte de tissu .

A) Rôle de la phosphorylation dans l'absorption active du glucose

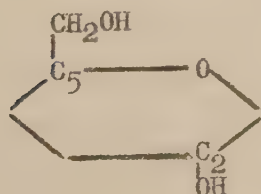
L'hypothèse de la phosphorylation et déphosphorylation a été proposée comme un mécanisme d'absorption de glucose dès 1933 par WILBRANDT et LASZT (128) . Le glucose, pour être absorbé, serait phosphorylé par l'hexokinase à la surface luminale de la cellule épithéliale, puis diffusent à l'intérieur de la cellule sous forme de glucose - 6 - phosphate, celui-ci après déphosphorylation par une phosphatase de la bordure séreuse, passerait à l'état libre dans le sang (34) . Divers faits étaient en faveur de cette thèse :
l'augmentation de la concentration de certains phosphates organiques

(36) (67) et surtout l'accumulation des hexoses phosphates (63,78) dans l'épithélium intestinal pendant l'absorption des sucres . En outre, les inhibiteurs considérés à l'époque comme spécifiques des réactions de phosphorylation (iodoacétate et phloridzine) bloquaient le transport des sucres (128) .

Plusieurs études récentes infirment cependant cette théorie . L'iodoacétate qui réagit avec le groupement sulfhydryle de plusieurs protéines ne pouvait être considéré comme un inhibiteur spécifique de la phosphorylation . Par ailleurs, SOLS (105) a démontré que l'absorption active des sucres à partir de l'intestin n'impliquait nullement leur phosphorylation . WILSON et CRANE (129) en 1958, WILSON et LANDAU (130) en 1960 observaient ce fait sur une grande variété de sucres et sur leurs dérivés cependant activement absorbés . Enfin ils ont montré que les composés 1-déoxy-D-glucose et 6-déoxy-D-glucose ayant perdu les groupes OH sur lesquels se fait la phosphorylation et qui sont nécessaires au transport actif, sont cependant tous deux absorbés contre un gradient de concentration.

B.) Existence d'une forme structurale nécessaire au transport actif

En 1958, WILSON et CRANE (129) ont montré qu'une structure pyranosique, un groupement méthyle, ou méthyle-substitué en C₅ et un groupe hydroxyle en C₂ sont nécessaires pour que l'hexose soit activement transporté, CRANE et CRANE (23) ont réalisé des expériences avec H₂¹⁸O, glucose -₂C¹⁸OH et 2-C-hydroxyméthylglucose ; les résultats montrent que les étapes intermédiaires du transport actif n'ont pas nécessité ni le départ ni le transfert de l'oxygène ou de l'hydrogène du carbone C₂ .



Structure pyranosique avec un groupement méthyle ou méthyle substitué en C₅ et un groupement hydroxyle en C₂. (d'après Wilson et Crane, 1958)

JORGENSEN, LANDAU et WILSON (54), CRANE, MILLER et BIERER (25) ont mis en évidence une action compétitive entre les divers sucres activement transportés, mélangés dans une même solution . Tout se passe comme s'ils utilisaient le même transporteur . En revanche, si l'on ajoute au sucre activement transporté un autre non activement transporté, tel que le fructose, les taux individuels d'absorption restent inchangés . Le système de transport actif des sucres semble spécifique d'une structure déterminée, identique pour tous les hexoses comportant les caractéristiques mentionnées ci dessus .

C) Hypothèse de l'existence d'un couplage du transport actif du glucose avec la pompe à sodium .

Dans des expériences "in vitro" de divers groupes de chercheurs, il a été montré que les cations présents dans le milieu pouvaient influencer fortement l'absorption des sucres par l'intestin de cobaye, en survie (92) . Ce phénomène a été retrouvé en 1960 chez le rat par CSAKY et ZOLLICOFFER . Selon ces auteurs, le Na^+ doit être présent mais seulement du côté muqueux (29,73, 93) . Il existe même une corrélation directe entre la concentration en Na^+ du milieu et le transport des sucres, ce qui amenait CRANE, MILLER et BIERER (25) à proposer en 1961 un schéma selon lequel la molécule de glucose entre dans la bordure en brosse de la cellule intestinale sous forme d'un complexe sucre-transporteur- Na^+ .

CRANE (22) admettait que le transport actif du Na^+ était couplé au transport actif du glucose, que les deux systèmes se localisent dans la bordure en brosse et que l'ion Na^+ est nécessaire à la traversée de cette bordure en brosse par le glucose . A l'intérieur de la cellule, le complexe était dissocié : le Na^+ étant expulsé par un mécanisme osmomotique vers l'extérieur, tandis que le glucose lui-même est efficacement piégé à l'intérieur du cytoplasme

SCHULTZ et ZAIUSKY (1964) modifiaient l'hypothèse de

CRANE en situant la pompe à Na^+ au niveau de la membrane séreuse car l'inhibition par l'ouabaine est plus efficace à la face séreuse qu'à la face muqueuse . D'autre part, plusieurs auteurs (16, 37) ont précisé que, in vitro, il n'y a pas d'effet de sodium sur l'entrée du glucose dans les entérocytes du rat, mais que le transport net du sucre au sein de la cellule était en corrélation avec les mouvements du Na^+ . Le Na^+ ne serait pas nécessaire à l'entrée du glucose dans la cellule, mais interviendrait dans son transfert de la face muqueuse à la face séreuse . CSAKY (27), COHEN et HUANG (19) ont étendu ces recherches en démontrant que le Na^+ est également essentiel au transport intestinal des amino-acides et des pyrimidines . CSAKY (27) a suggéré que le rôle du Na^+ , lié à la partie active du transport, est d'intervenir dans la conversion de l'énergie chimique en énergie osmotique ; la digitaline qui agit comme inhibiteur spécifique de cette pompe à Na^+ par blocage de la respiration cellulaire, abolit également le transport actif des sucres .

D) Force ionique et potentiel électrique au cours du transport actif du glucose .

L'existence d'une relation entre le transport actif du sodium et le transport actif du sucre était démontré par la mesure de l'intensité du courant de court-circuit entre les faces séreuse et muqueuse de l'iléon de lapin (100) . L'augmentation du courant de court-circuit et de la différence de potentiel transmurale commence dans les cinq secondes qui suivent l'addition du glucose au milieu extérieur d'incubation, et accuse un maximum dans la minute qui suit . La rapidité de l'effet du glucose suggérerait une fonction autre que son rôle de libérateur d'énergie . Par ailleurs, le fructose métabolisé par l'intestin, mais non activement transporté, ne provoque pas l'augmentation de l'intensité de courant de court-circuit, alors que le 3-0-méthylglucose non métabolisé mais activement transporté, procure une rapide élévation de cette même intensité ;

en outre, l'addition du sucre activement transporté vers le côté séreux n'a pas d'effet sur le courant de court-circuit tandis que l'addition de ces sucres sur le côté muqueux provoque une rapide élévation d'intensité du courant de court-circuit . Tous ces faits ont permis à ces auteurs de conclure avec BARRY, DILSTEIN, MATTHEWS, SMYTH et WRIGHT (9) qu'il existe une interaction entre les mécanismes responsables du transport actif du glucose et du Na^+ .

E) Activité de l'ATPase et processus de transport .

CSAKY (1963) attribuait au Na^+ un autre rôle dans le transport actif du glucose qui évidemment nécessite une fourniture d'énergie . Le Na^+ est nécessaire à l'utilisation de l'ATP, car il active l'ATPase, enzyme responsable de l'hydrolyse de l'ATP . Cependant la relation étroite entre l'énergie endergonique fournie par l'ATP et le transport actif n'a pu être précisée .

En 1964, NIWEY et SMYTH (80), ayant observé que le 3-O-Méthylglucose inhibe le transport intestinal de la glycine et de la méthionine, suggéraient que les sucres et amino-acides étaient en compétition pour l'ATP disponible en quantité limitée . Mais la même compétition devrait intervenir entre le Na^+ et le 3-O-Méthylglucose ; Les résultats expérimentaux sont cependant en opposition avec cette explication .

F) Sites actifs du système de transport du glucose .

L'existence du couplage de l'absorption active du glucose avec le fonctionnement de la pompe à sodium, a incité plusieurs auteurs à postuler un système de transport actif du glucose à l'intérieur des entérocytes, et à préciser la nature des sites actifs de ce système . Ils ont employé les inhibiteurs métaboliques pour mettre en évidence ces sites actifs, et les différentes étapes plus ou moins indépendantes de l'absorption intestinale .

PARSONS, SMYTH et TAYLOR (86) ont observé par la méthode d'un segment intestinal éversé, que le dinitrophénol ($2 \cdot 10^{-4}M$) ou l'anaérobiose abolissaient complètement le transfert du glucose vers la séreuse, mais n'empêchaient pas l'entrée du glucose dans les cellules de la muqueuse : cette entrée du glucose ne dépend donc pas de l'énergie métabolique libérée en aérobie .

Par contre la phloridzine, agissant à la fois "in vitro" et "in vivo" (NEWBY et coll. 80) sur l'absorption du glucose, modifie surtout le passage de ce nutriment à travers la membrane du côté muqueux . Son action est différente de celle de l'anoxie ou du dinitrophénol ; la phloridzine agit spécifiquement sur la pénétration du glucose dans la cellule par le côté muqueux (3, 17) .

L'utilisation d'un autre inhibiteur, la cétrimide, a permis à MART et NISSEN (43) de postuler un système de transport actif à deux sites récepteurs, le premier commun à plusieurs sucres et le second spécifique pour chaque hexose .

L'effet des inhibiteurs a aussi été examiné comme intervenant dans le mécanisme enzymatique du transport actif . Ainsi HABERT et QUASTEL (cf.43) ont signalé l'action inhibitrice des salicylates sur le transport actif du glucose à l'intérieur de l'intestin ; Ils l'attribuent à un effet découpleur de l'oxydation phosphorylante, provoquant une diminution de l'ATP cellulaire disponible pour le transfert intracellulaire du glucose .

G) Intervention des enzymes .

Le concept de transport actif est fortement lié à l'hypothèse d'un système transporteur, d'un composant mobile de la membrane qui posséderait des sites actifs ou des groupements chimiques actifs, sur lesquels pourraient s'attacher les molécules de sucres . La possibilité de saturation d'un tel système de transport n'exclut pas l'intervention d'enzymes . Plusieurs d'entre elles sont d'ailleurs spécifiquement impliquées dans le transport du glucose .

Parmi elles, citons les perméases, enzymes possédant une fonction bien déterminée dans la pénétration cellulaire des divers sucres . A chaque substrat correspond une perméase et seule la glucose perméase serait induite d'emblée, tout au moins chez les micro organismes . Les études concernant ces enzymes dans le cas des micro organismes ont été amplement développées par KEPES (58) 1964 .

Plus récemment, la mise en évidence de l'existence de la phosphoénol pyruvate transférase dans l'intestin de rat (WEISER et ISSELBACHER 1969) et du caractère de fonctionnement vectoriel de cette enzyme soutient l'hypothèse faisant intervenir un mécanisme de translocation de groupe dans le transport du glucose (KABACK), très favorable au concept de structure globulaire des membranes , développé par M. PASCAUD (87). La phosphorylation du glucose, idée momentanément abandonnée, a été remise à l'étude et dès à présent on envisage que le glucose-1-phosphate serait chez les micro organismes un des plus importants facteurs de régulation de l'absorption et aussi du métabolisme des glucides (KABACK 1970) . Nous pensons devoir signaler l'hypothèse émise par KESTON selon laquelle la mutarotase aurait un rôle dans le transport actif du glucose . Cependant FAUST ne trouvait pas de différence entre le transport intestinal des α et β D glucoses .(59, 37^{bis}) .

*

* * *

Cette brève revue des différentes méthodes d'études et théories concernant l'absorption du glucose met en évidence la complexité de ce processus et le nombre important des facteurs pouvant modifier les mécanismes mis en jeu .

Au point de vue nutrition, il nous a paru intéressant d'étudier l'absorption du glucose en considérant non seulement les

éléments intrinsèques des entérocytes mais aussi l'intervention des substances qui, indispensables à l'organisme, sont constamment présentes dans une alimentation adéquate, c'est le cas des vitamines .

Les expériences concernant les interrelations entre les vitamines et l'absorption sont souvent conçues en soumettant l'animal à un régime carencé en telle ou telle vitamine (BLY et coll.), les perturbations métaboliques qui en découlent sont difficiles à analyser et entraînent des modifications du fonctionnement des cellules en général et de l'absorption par les entérocytes en particulier . Chez l'animal ingérant un régime complet dans lequel la vitamine étudiée est introduite en quantité variable, elle provoque une réponse de l'organisme beaucoup plus significative .

Nos recherches personnelles ont porté sur l'influence de l'acide pantothénique sur l'absorption du glucose par une anse de Thiry-Vella chez le rat . Nous pouvons ainsi saisir son action sur le transport actif du glucose et suivre le devenir de ce nutriment au delà de la barrière intestinale .

PARTIE TECHNIQUE

A Méthode à la glucose oxydase (glycémie)I - Principe

Le glucose est oxydé par la glucose oxydase en acide gluconique avec libération de peroxyde d'hydrogène qui, à son tour, est décomposé par la peroxydase en eau et oxygène naissant. Ce dernier forme avec l'o-dianisidine un complexe jaune dont l'intensité de coloration est proportionnelle à la teneur en glucose et dosée colorimétriquement à 436 nm.

2 - Réactifs (Biotrol)

Solution tampon enzyme tampon phosphate pH7 0,12 M ; glucose oxydase 250 g/ml ; peroxydase 40 g/ml . Solution de chlorhydrate d'o-dianisidine 6,6 mg/ml . Solution d'acide perchlorique 0,33 M
Solution étalon de glucose 100 µg/ml . Solution anticoagulante de fluorure de potassium 4% et d'exalate de Na à 4% (v/v, EI).

3 - Mode opératoire

On récolte de 1 à 2 ml de sang dans des tubes à hémolyse ayant au préalable reçu 4 gouttes de la solution anticoagulante et séché pendant 4 h. à 100°. On déprotéine ensuite 0,1 ml de sang dans 1 ml d'acide perchlorique 0,33M; On centrifuge et on prélève le surnageant pour doser le glucose.

On mélange extemporanément, en quantité nécessaire pour le dosage, la solution de chromogène et la solution tampon enzyme dans le rapport 1 : 100.

Chaque dosage comporte une série de tubes témoin eau, étalon glucose et échantillon dans lesquels on ajoute des prises aliquotes

correspondantes de 0,16 ml, puis 3 ml de mélange tampon enzyme - chromogène. La réaction colorée se développe à la température ambiante. Après 35 minutes exactement, on lit contre le blanc au spectrophotomètre (436 nm).

4 - Calcul

La glycémie est déterminée par le rapport :

$$\frac{\text{Densité optique échantillon}}{\text{Densité optique étalon glucose}} = \text{g de glucose par litre de sang}$$

B Méthode d'HOFFMAN adaptée à l'autoanalyseur

I - Principe

La fonction semi-aldéhydique du glucose réduit une solution jaune de ferricyanure de potassium en ferrocyanure incolore. Cette décoloration est proportionnelle à la concentration en glucose du milieu et mesurée au colorimètre à 436 nm avec une cuve à flux continu d'épaisseur 15 mm.

2 - Réactifs (Produits PROLABO R.P. pour analyse)

a - Dosage en discontinu (Perfusats) - gamme d'étalon de solutions de glucose 5 mg par ml à 45 mg par ml

Diluant : chlorure de sodium 9 g, Eau distillée q.s. 100 ml, Brig 35 0,5 ml.

Solution de ferricyanure de Potassium alcalin : Ferricyanure de Potassium 0,36 g, Carbonate de Sodium anhydre 28 g, Chlorure de Sodium 9 g, Eau distillée q.s. 100 ml, Brig 35 0,5 ml.

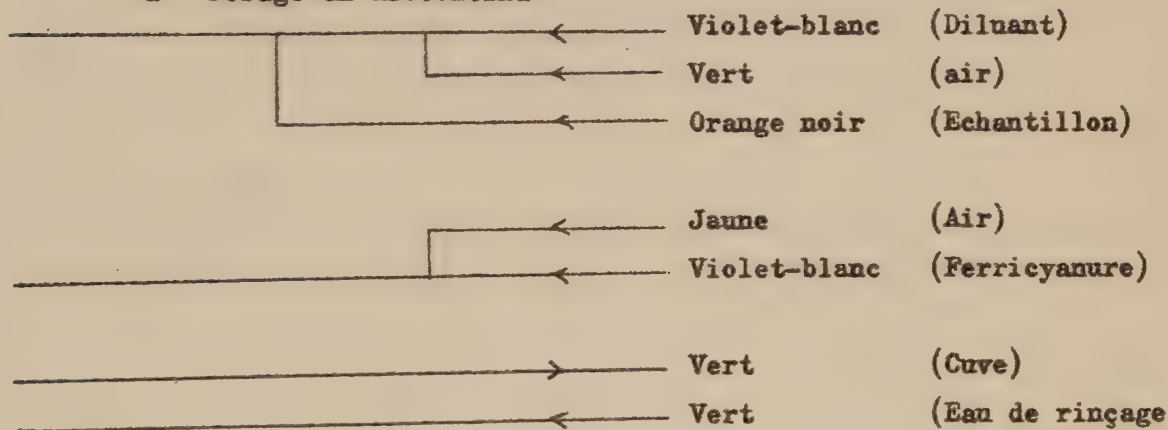
b - Dosage en continu (glycémie). Gamme d'étalon de solutions de glucose de 1 mg par ml à 8 mg par ml (sans extenseur d'échelle) et gamme d'étalon de solutions de glucose de 0,5 mg par ml à 4 mg par ml (avec extenseur d'échelle : sensibilité x 2).

Diluant : Chlorure de Sodium 9 g, Eau distillée q.s. 1000 ml, Brig 35 0,5 ml.

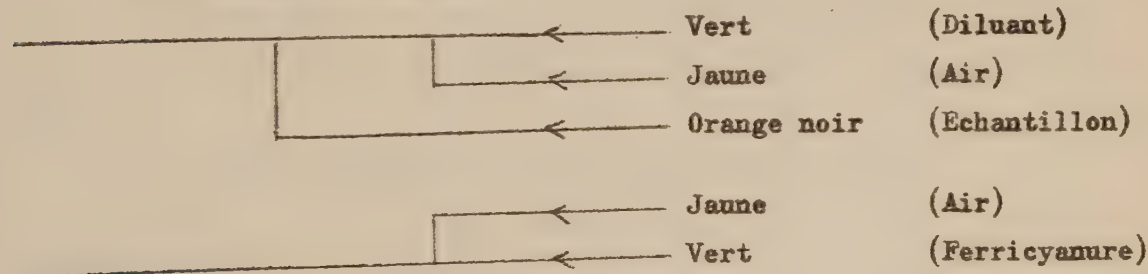
Solution de ferricyanure de Potassium 0,25 g, Carbonate de Sodium anhydre 20 g, Chlorure de Sodium 9 g, Eau distillée q.s. 1000 ml, Brig 35 0,5 ml.

3 - Montage des tubes de pompe (Tubes PVC Technicon)

a - Dosage en discontinu



b - Dosage en continu



DOSAGE DU GLYCOGENE

I - Principe

Nous dosons le glycogène selon la méthode à l'anthrone décrite par HASSID et ABRAHAM (44). La prise de l'échantillon est faite de manière à comporter, dans un volume déterminé, une quantité globale de glycogène qui, après hydrolyse acide à chaud, est équivalente à 50 - 150 µg de glucose. Le glucose présent est dosé colométriquement avec l'anthrone à 620 nm.

2 - Réactifs

A - Potasse à 30 %

B - Solution sulfurique d'anthrone fraîchement préparée (100 ml de SO_4H_2 à 95 % + Anthrone 200 mg)

C - Solution standard de glucose de 20 µg par ml

3 - Mode opératoire

Après une digestion à la potasse 30 % à 100°C pendant 30 minutes, l'extrait hépatique est dilué et complété à 50 ml par de l'eau distillée. On fait une prise de 1 à 2 ml que l'on amène à 5 ml.

Le blanc est constitué par 5 ml d'eau distillée, et le standard à 100 µg de glucose par 5 ml de solution C.

Tous les tubes étant plongés dans un bain de glace, on y ajoute 10 ml de solution B, et on mélange bien. On porte le tout au bain-marie à 100°C pendant dix minutes, puis on laisse refroidir pendant dix minutes exactement (les 5 premières minutes les tubes sont mis dans un bain de glace).

On mesure aussitôt l'intensité des colorations.

4 - Calcul

Soit S la densité optique de 100 µg de glucose, U la densité optique de la solution à mesurer, E la prise d'essai en ml, D la dilution de l'échantillon après la digestion à la potasse, p le poids de l'échantillon de foie en g, la quantité de glycogène est donnée par la formule :

$$\left(\frac{100. U}{1,11 . S} \right) \left(\frac{D}{E.p} \right) = \mu g \text{ de glycogène par g de foie,}$$

1,11 étant le facteur de conversion du glucose en glycogène déterminé par MORRIS, cité par HASSID et ABRAHAM (44).

DOSAGE DE COENZYME A

(Technique de LE VAN HUNG^a)

1 - Principe

L'acétylase du foie de pigeon acétyle la sulfanilamide en présence du coenzyme A et en fonction de sa concentration dans le milieu. On estime le coenzyme A en mesurant à 554 nm la réaction colorée de la sulfanilamide libre restante avec le N - α - naphthyl - N - diéthylpropylènediamine.

2 - Procédé d'obtention de l'acétylase (LE VAN HUNG^b)

On prépare à partir de la fraction cytoplasmique de l'homogénat de foie de pigeon dans du tampon pH 7,4 (p/v, 1:2), obtenu par centrifugation à basse température à la vitesse de 100.000g pendant 2 heures. Le cytoplasme homogène ayant une teneur en protéine d'environ 70 mg/ml est ensuite mis à vieillir à 0°C pendant 14 jours. On centrifuge alors à grande vitesse à la température de 4°C pendant 10 minutes; on prélève soigneusement toute la partie surnageante; on la répartit par fractions de 3 à 4 ml dans des tubes à hémolyse en pyrex. On les bouche et on les conserve à -25°C sans préjudice à l'activité de l'enzyme pendant plusieurs mois. Au moment de son emploi, l'enzyme est rapidement ramené à 4°C et gardé à cette température.

3 - Réactifs (Prolabo, RP pour analyse)

a - Réactifs pour l'acétylation

On prépare extemporanément un mélange dans les proportions suivantes : 0,36 ml de solution de sulfanilamide à 1 mg/ml + 0,6 ml de solution d'ATP à 60 mg/ml + 0,36 ml de solution de citrate de soude à 100 mg/ml + 0,9 ml de solution de bicarbonate de soude à 16,5 mg/ml +

b - Réactifs pour la diazotation de la sulfanilamide libre

Solution d'acide trichloracétique à 10 p. 100 ; solution de HCl 4N ; solution de nitrite de soude à 1 mg/ml ; solution de sulfamate d'ammonium à 5 mg/ml ; solution de chlorhydrate de N- α -naphthyl-diéthyl-propylènediamine à 0,5 mg/ml.

4 - Préparation des échantillons

Après sacrifice de l'animal, les tissus sont prélevés rapidement lavés à l'eau bidistillée glacée, essorés puis homogénisés dans 39 fois son poids d'eau bidistillée pour le foie et 9 fois son poids d'eau pour l'intestin. 2 ml d'homogénat est mis à chauffer dans un bain-marie à 100°C pendant 7 minutes, puis centrifugés à 4.000 tours pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant sert au dosage du CoA. La prise d'essai est de 0,04ml pour le foie et 0,10 ml pour l'intestin.

5 - Mode opératoire

Tous les dosages sont faits en double. On dispose les tubes sur un portoir puis on les met dans de l'eau glacée. On ajoute successivement 0,1 ml de mélange "a" pour l'acétylation, puis 0,1 ml de l'acétylase. Pour la courbe d'étalon on fait une gamme de 0 , 0,2 , 0,4 , 0,6 et 0,8 μ g de CoA avec une solution de 5 μ g de CoA par ml et pour les échantillons, on fait des prises aliquotes correspondantes à chaque homogénat. On complète ensuite tous les tubes à 0,4 ml avec du tampon phosphate et les porte au bain-marie à 37°C . L'incubation dure 50 minutes. On arrête la réaction en mettant 1,5 ml de la solution d'acide trichloracétique à 10 p. 100 . On agite bien puis on ajoute successivement 0,5 ml de solution de chacun des réactifs pour la diazotation en agitant bien après introduction de chaque réactif. On laisse la coloration se développer pendant 40 minutes, on centrifuge à 6.000 pendant 10 minutes. Le surnageant coloré est lu au spectrophotomètre à 554 nm.

6 - Calcul de la concentration en CoA du tissu

Soit x , la quantité de CoA déterminée d'après la droite d'étalon, on a suivant le tissu :

$$x \cdot 10^3 \text{ } \mu\text{g de CoA / g de foie frais.}$$

$$x \cdot 10^2 \text{ } \mu\text{g de CoA / g d'intestin frais.}$$

DOSAGE DE L'ACIDE PANTOTHÉNIQUE

(Méthode de H.R. SKEGGS et L.D. WRIGHT)

1 - Principe

L'acide pantothénique est mesuré indirectement en estimant la prolifération de *Lactobacillus plantarum* (par turbidimétrie à 576 nm) dont la croissance est proportionnelle à la quantité d'acide pantothénique libre dans le milieu.

2 - Préparation des échantillons

L'acide pantothénique libre est dosé directement sur l'homogénat après déprotéinisation tandis que l'acide pantothénique total exige une autolyse préalable de l'homogénat à 37° pendant 16 heures.

3 - Milieu sans acide pantothénique

Nous utilisons le milieu préparé par LIFCO. Après dissolution adéquate, le milieu est porté à ébullition pendant 3 minutes, filtré et conservé au froid une semaine sans altération.

4 - Culture

Souche *Lactobacillus plantarum* (Institut Pasteur) . On prépare le milieu de culture en ajoutant à 8 ml de milieu sans acide pantothénique (LIFCO) 2 ml d'une solution d'acide pantothénique à 100 mg/ml. La croissance se fait à 32° pendant 18 h. Ensuite, on procède à 3 ringages avec du sérum physiologique stérile, le surnageant est décanté après centrifugation à 4° et à petite vitesse pendant 6 minutes. Le précipité est remis en suspension avec du sérum physiologique. La culture de *Lactobacillus plantarum* peut se conserver stérile ent et à froid pendant 3 jours.

5 - Préparation de la gamme et dosage

- Solution mère : 54,4 mg de pantothénate de calcium (Produit Roche) dans 500 ml d'eau bidistillée (conservée 6 mois stérilement).

- Solution intermédiaire : 5 ml de solution mère complétés à 100 ml d'eau bidistillée (conservée 1 mois stérilement) .

- Solution étalon extemporanée : 1 ml solution intermédiaire complété à 50 ml (100 μ g/ml) .

Les tubes bien repérés sur des portoirs reçoivent 0 ml, 0,1 ml, 0,2 ml etc... jusqu'à 1 ml de la solution étalon pour la gamme et une prise aliquote pour chaque échantillon à doser. On complète à 5 ml avec de l'eau bidistillée puis à 10 ml avec le milieu MFCO. Les tubes sont bouchés avec du coton cardé et portés à 120°C dans un autoclave pendant 12 minutes. On les laisse refroidir puis on les ensemence en mettant stérilement 2 gouttes de culture dans chaque tube. On les agite bien. Les tubes sont rebouchés au fur et à mesure avec le même coton cardé. L'incubation se fait à 32°C pendant 16 heures. La croissance dans chaque tube est estimée par turbidimétrie à 576 nm (Spectrophotomètre Jobin Yvon).

6 - Calcul

Soit x μ g d'acide pantothénique déterminé d'après la courbe d'étalon pour une prise de p ml et D le facteur de dilution (80 pour le foie et 20 pour l'intestin), on a :

$$\frac{x \cdot D}{p} \cdot 10^3 = \mu\text{g d'acide pantothénique par gramme de tissu frais.}$$

DETERMINATION DE L'ACTIVITE DE LA GLYCOGENE SYNTHETASE

1 - Principe de la méthode (Leloir et Goldemberg)

On mesure l'activité de la glycogène synthétase en fonction de la quantité d'UDP libéré à partir d'UDP-glucose en présence de glycogène et de glucose-6-phosphate. L'UDP est ensuite déterminé par la quantité de pyruvate formé après transfert à l'UDP du ou groupement phosphate du phospho-énolpyruvate sous l'influence de la pyruvate kinase :



le pyruvate libéré forme avec le dinitrophénylhydrazine un complexe coloré que l'on mesure à 520 nm .

2 - Préparation de l'enzyme

Les animaux utilisés sont des rats mâles de souche Wistar, pesant de 250 à 350 grammes. Ils sont nourris au régime UAR (régime commercial de la firme "l'Alimentation Rationnelle"). La veille du sacrifice, on remplace les aliments par du sucre en poudre. Après décapitation de l'animal, le foie est rapidement prélevé et plongé dans un b cher taré contenant 10 ml de solution (saccharose 0,25 M + EDTA 0,01 M) maintenu à 4 C . On pèse le foie et complète le volume de manière à avoir 3 ml de saccharose par gramme de foie. On homog nise dans un Potter - Elvehjem, puis on centrifuge l'homogénat pendant 10 minutes à 2000 σ dans une centrifugeuse refroidie "Jouan type G 60" ; le surnageant constitue l'extract brut de la glycogène synthétase du foie (le fait de peser le foie plongé dans du saccharose à 4 C nous semble plus satisfaisant quant à la conservation de l'activité de base de l'enzyme). Toutes les opérations se font à une température voisine de 4 C .

3 - Réactifs utilisés

Les solutions aqueuses sont faites avec de l'eau bidistillée.

UDPG solution aqueuse 0,025 M ; PEP 0,01 M dans une solution de CLK 0,04 M ; Pyruvate kinase 0,1 ml dans 0,9 ml solution de SO_4^{2-} 0,1 M

Dinitrophénylhydrazine 0,1 pour 100 dans HCl 2 N ; NaOH 10 N ; Alcool 95° ; solution tampon à volume égal de : glycérolène 40 mg par ml (solution aqueuse), glycine 0,75 M (solution aqueuse contenant EDTA 0,025 M), et glucose-6-phosphate 0,05 M (solution aqueuse) ; Milieu de protection "MP" (adaptation du milieu basique de LE VAN HUNG^a) utilisé pour dissoudre le CoA et l'acide pantothénique : ATP 0,06 ml d'une solution aqueuse à 60 mg par ml, Citrate de sodium 0,03 ml d'une solution aqueuse à 100 mg par ml ; Bicarbonate de sodium 0,27 ml d'une solution aqueuse à 16,5 mg par ml ; solution de CoA : 50 µg, 100 µg, 200 µg de CoA par ml de milieu MP ; solution d'acide pantothénique : 500 µg, 1000 µg, 2000 µg de pantothénate de calcium par ml de milieu MP.

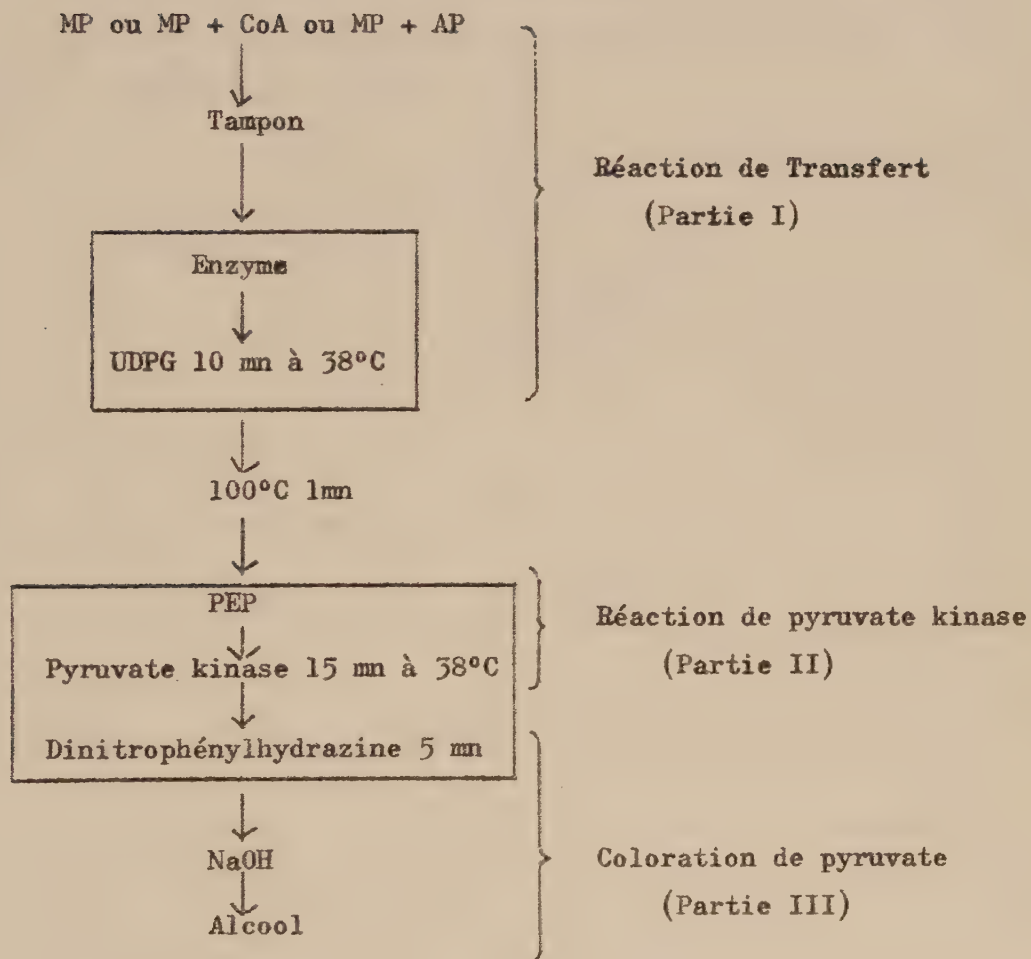
4 - Dosage de l'activité de la glycérolène synthétase

Nous procédons par série de 4 tubes : le blanc (dans lequel l'UMP est ajouté après l'action de l'eau bouillante à 100°C pendant une minute, ce qui permet de tenir compte de la quantité d'UMP contenu dans l'extrait brut), l'enzyme , l'enzyme + CoA et l'enzyme + AP .

Dans les tubes à hémolyse, nous mettons dans l'ordre : 0,01 de solution MP , MP + CoA ou MP + AP puis 0,06 ml de tampon et ensuite 0,01 ml de l'extrait brut. Tous les tubes sont mis à incuber dans un bain-marie à plateau agit et réglé à 38°C . Deux minutes après, on ajoute dans chaque tube 0,02 ml d'UMP puis on déclenche l'agitation pour assurer un mélange homogène des réactifs. Au bout de 10 minutes, on arrête la réaction de transfert en plongeant tous les tubes dans l'eau bouillante à 100°C pendant une minute.

Après refroidissement, les tubes sont remis au bain-marie, puis on détermine l'UDP libéré en ajoutant successive ment : 0,05 ml de PMP, 0,05 ml de pyruvate kinase, l'agitation étant immédiatement remise en marche; on l'arrête au bout de quinze minutes et l'on ajoute : 0,5 ml de solution de dinitrophénylhydrazine. Après 5 minutes, on ajoute dans chaque tube 0,4 ml de NaOH 10 N puis 2,2 ml d'alcool à 95°. Les tubes sont alors centrifugés à 4000 g pendant sept minutes. La coloration développée dans chaque tube est estimée au spectrophotomètre à 520 nm.

Schéma du mode opératoire



(Les réactifs encadrés sont ajoutés seulement après la mise des tubes dans l'incubateur) .

REMARQUES CONCERNANT LE MATERIEL ANIMAL ET LE CALCUL STATISTIQUE

1 - Nous avons utilisé des rats mâles adultes de souche Chapet de 250 à 300 g. Ils ont été nourris au régime complet et équilibré UAR (Firme Alimentation Rationnelle) depuis 2 semaines . Avant les expériences, les animaux ont été soumis à une diète hydrique de 18 heures .

2 - Chaque résultat est affecté de sa déviation standard calculée d'après la formule :

$$s = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n(n-1)}}$$

RECHERCHES PERSONNELLES

PREMIERE PARTIE

INFLUENCE DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE SUR L'ABSORPTION
INTESTINALE DU GLUCOSE

CHAPITRE I

METHODES D'ETUDES

L'intérêt des études "in vivo" de l'absorption intestinale est de nous permettre de suivre dans l'organisme le devenir d'un nutriment après son absorption . Parmi les méthodes utilisées "in vivo", nous avons choisi l'anse de Thiry-Vella qui a l'avantage de conserver toutes ses connexions vasculaires et nerveuses et de se prêter à des expériences très proches des conditions physiologiques du transit intestinal . Il est certain que chez le rat, la réalisation de l'anse de Thiry-Vella "permanente" présente certaines difficultés, c'est pourquoi il est utile de rechercher s'il existe une similitude fonctionnelle entre les anses de Thiry-Vella "temporaire" et "permanente" au point de vue de l'absorption du glucose, car dans plusieurs expériences, les animaux sont sacrifiés après perfusion pour étudier le devenir de ce nutriment dans l'organisme .

I - Obtention des divers types d'anse de Thiry-Vella sur le Rat

A- Technique de réalisation de l'anse de Thiry-Vella "temporaire" simple

a) Matériel

Nous indiquerons le matériel chirurgical utilisé :

1 paire de ciseaux droits, 2 paires de pinces de Chaput, 2 paires de pinces à pointes courbes, 2 pinces hémostatiques, 1 aiguille

à suture droite n° 10, 4 aiguilles à suture droite n° 12, fil de lin, soie de Kalt n° 00, tubes en plastique de 2 mm de diamètre utilisé comme support interne pour l'anastomose, deux embouts spéciaux en plastique (Komarov, Bralow & Boyd 1963) à diamètre s'adaptant parfaitement aux canules de travail pour l'abouchement de l'anse de Thiry-Vella (fig. 1), compresses .

b) Mode opératoire

1 - Repérage et isolement du segment intestinal à étudier

Après une anesthésie au Nembutal (Ethyl-méthyl-butyl barbiturate de sodium en solution à 5 p. 100) par voie intrapéritonéale à raison de 0,8 ml par kg de poids vif, le rat est couché sur le dos . La région abdominale est largement épilée depuis le cercle hypocondrial jusqu'à la région pubienne .

Une incision médiane de la paroi abdominale de 3 cm est pratiquée à partir de l'extrémité de l'appendice xyphoïde . Le jéjunum est repéré et extériorisé . On choisit à 2 cm de son passage sous-mésentérique un segment de 20 cm de long . Ce segment est isolé par 2 incisions qui sont faites toujours au centre des arcades vasculaires ; celles-ci ont été ligaturées au préalable avec la soie de Kalt en 2 points séparés encadrant chaque ligne d'incision pour assurer l'hémostase . Ce segment est enfoui dans la cavité abdominale en attendant la réalisation de la continuité du reste .

2 - Réalisation de la continuité du tractus digestif

L'anastomose est de type terminoterminal. On commence par introduire un bout du tube en plastique servant de support, dans une extrémité intestinale ; on le maintient par une ligature avec du fil de lin enserrant à la fois l'intestin et le support . On procède de même pour l'autre bout du support et la deuxième extrémité intestinale à anastomoser . Les chefs libres des 2 ligatures sont noués ensemble pour consolider l'anastomose qui est enfouie dans la cavité abdominale .

3 - Abouchement de l'anse intestinale isolée

Deux embouts spéciaux sont fixés aux deux extrémités du segment intestinal isolé, par simple ligature avec du fil de lin (Cf. fg. 1) . L'extrémité en amont de l'anse étant repérée, les embouts sont mis en place par deux ligatures en bourse, aux commissures de l'incision . Celle-ci est ensuite fermée par un sujet au fil de lin intéressant tous les plans anatomiques . Ainsi l'anse isolée demeurant dans la cavité abdominale, ne communique avec l'extérieur que par ses extrémités .

On vérifie la perméabilité de l'anse de Thiry-Vella en injectant de l'eau distillée par l'embout en amont et en recueillant le liquide à la sortie par l'embout en aval . La rat est alors apte à recevoir ^{une} perfusion intestinale .

B - Technique de réalisation de l'anse de Thiry-Vella "temporaire" double

L'anse de Thiry-Vella double comporte deux portions jéjunales adjacentes de 20 cm, qui sont isolées et abouchées suivant la même technique de réalisation de l'anse de Thiry-Vella "temporaire" simple . La continuité du tube digestif est assurée par une seule anastomose de type terminoterminal . Les extrémités des deux anses jéjunales sont groupées deux à deux et fixées sur la ligne d'incision .

Le rat porteur de l'anse de Thiry-Vella "temporaire" double est ici encore immédiatement apte à recevoir deux circuits indépendants de perfusion .

C - Technique de réalisation de l'anse de Thiry-Vella "permanente" simple

a) Matériel

Le matériel utilisé est le même que dans l'opération pour la réalisation de l'anse de Thiry-Vella "temporaire" . Un détail est cependant à noter : le support interne servant à l'anastomose n'est

plus en plastique , il est remplacé par des segments de spaghetti ou macaroni ayant un diamètre de 2mm .

L'asepsie est assurée par un antibiotique .

b) Mode opératoire

Si le repérage et l'isolement de portion jéjunale à utiliser sont identiques au cas précédent, il n'en est pas de même pour la réalisation de la continuité du tube digestif et de l'abouchement des extrémités du segment intestinal isolé . Ici la finesse technique, les soins et l'asepsie sont de rigueur puisque l'on vise à maintenir les animaux vivants longtemps après l'opération . La méthode décrite ci-dessous est personnelle .

1 - Réalisation de la continuité du tube digestif

L'anastomose est de type terminoterminal . On commence par rapprocher les deux extrémités de l'intestin en posant, au-delà des insertions mésentériques de l'intestin, un premier point de suture avec de la soie de Kalt . A ce moment, un bâtonnet de pâte alimentaire (2 à 3 cm de long) servant de support, est introduit à l'intérieur des deux portions intestinales ainsi rapprochées et prêtes pour la suture (fig. 2) . Un surjet séroséreux de Lambert "modifié" avec le même fil de soie de Kalt du premier point d'appui (Cf. fg. 3) assure l'étanchéité de l'anastomose . Le support est ensuite poussé loin de cette dernière que l'on recouvre par une partie libre de l'épiploon .

La mise en place d'un support interne qui se trouve d'abord ramolli en une demi-heure, puis dans les heures qui suivent digéré par les enzymes du suc intestinal, facilite la suture et permet d'opérer seul sans aide, contrairement à la technique classique . Celle-ci s'avère très délicate, dans le cas du rat, elle comporte la fixation préalable de 3 fils en 3 loci sur les extrémités intestinales à anastomoser ; les fils ainsi fixés doivent être minutieusement tendus

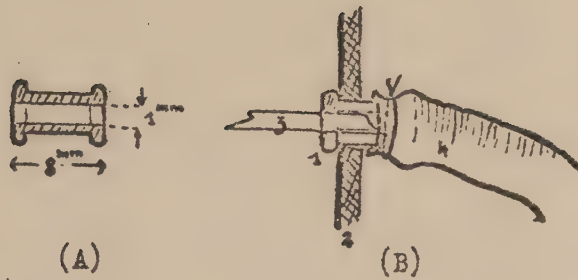


Fig. 1

- (A) Embout en plastique
- (B) Embout mis en place
 - (1) embout
 - (2) paroi abdominale
 - (3) canule de travail
 - (4) extrémité de l'anse intestinale



Fig. 2 Position du premier point du surjet au delà de l'insertion mésentérique.

- (1) Support interne,
- (2) Premier point du surjet
- (3) Extrémités de l'intestin
- (4) Arcade vasculaire mésentérique
- (5) Mésentère

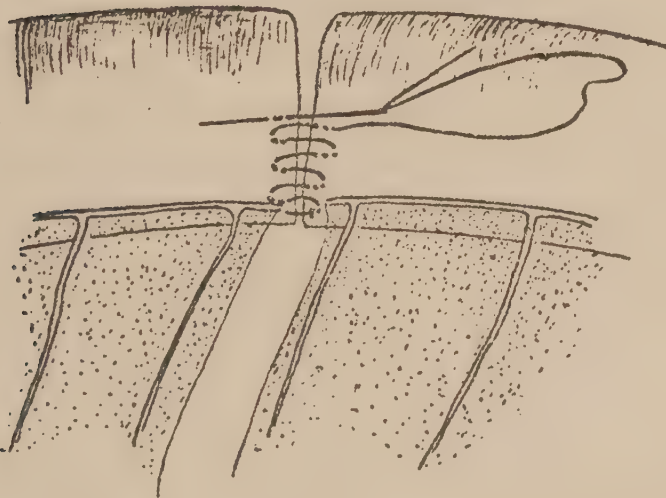


Fig. 3 Surjet de Lembert "modifié" : le fil décrit un S entre deux segments intestinaux à anastomoser.



Fig. 4 Section au niveau de l'anastomose intestinale, les pointillés indiquent l'épaisseur d'un simple surjet de Lembert.

par un aide durant toute l'opération .

Le surjet de Lambert est modifié en ce sens que l'aiguille attaque le plan séroséreux d'une extrémité du tractus intestinal suivant une ligne la plus proche possible du bord libre de la section et en ressort en un point plus éloigné, et reprend la deuxième extrémité de l'intestin de ^{la} même façon ; le fil décrit ainsi un S entre les lèvres des deux sections (fig. 4) .

Ce procédé permet de refouler la fraction inévitablement inversée de la section intestinale, et de réaliser une diminution d'épaisseur de l'ourlet cicatriciel, réduisant ainsi les risques de sténose et de rétrécissement (fig. 4) .

2 - Abouchement des extrémités du segment jéjunal isolé à la paroi abdominale

L'observation des attitudes du rat, montre l'avantage d'aboucher les deux extrémités du segment jéjunal le plus près possible du cercle de l'hypocondre que ni ses dents, ni ses griffes ne peuvent atteindre, ce qui rend inaccessibles à l'animal les abouchements intestinaux, une fois réalisés . Les deux boutonnières, orifices d'abouchement des deux extrémités du segment prélevé, sont obtenues en perçant en un seul geste tous les plans de la paroi abdominale à l'aide de petits ciseaux pointus à bords mousses . Elles sont élargies au diamètre du segment intestinal par simple écartement des branches des ciseaux . Chaque extrémité de l'anse jujénale est fixée à la peau avec de la soie de Kalt n° 00 par 3 ou 4 points séparés placés autour de l'orifice intestinal , et dont l'un au moins se situe au niveau de l'arcade vasculaire .

3 - Phase finale

L'asepsie est assurée par un antibiotique (soit pénicilline en poudre, soit tifomycine en solution huileuse) introduit en fin d'opération, dans la cavité abdominale qui est ensuite fermée par un surjet au fil de lin incluant les divers plans .

c) Conditions d'alimentation à respecter

Jeûne absolu pendant 48 heures, puis diète hydrique le 3e jour . A partir du 4e jour, nourriture en quantité progressive, ad libitum dès le 6ème jour .

d) Comportement des rats après l'opération .

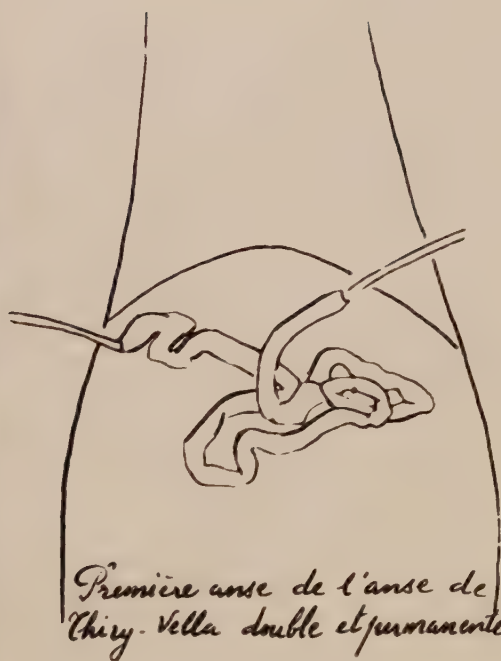
Les rats porteurs d'une anse de Thiry-Vella "permanente", sont souvent utilisables à partir de la 2ème semaine . Pratiquement la perméabilité des anses intestinales isolées est satisfaisante ; même dans le cas de rats porteurs d'anse de Thiry-Vella non utilisée depuis longtemps, on observe que l'orifice en aval est parfaitement perméable . Dans ce cas, la recherche de l'orifice situé en amont est guidée par la présence d'une petite cicatrice ou plus simplement par l'injection d'eau à l'aide d'un tube introduit dans l'orifice en aval . Le liquide injecté sous légère pression, fait saillie sous la peau, formant un dôme à l'endroit de l'orifice en amont . Il suffit alors de pratiquer une incision à l'aide de ciseaux pour que l'anse isolée soit à nouveau utilisable .

e) Complications possibles observées .

Fistule au niveau de l'anastomose terminoterminal (surtout à l'endroit d'insertion du mésentère) d'où péritonite infaillible .

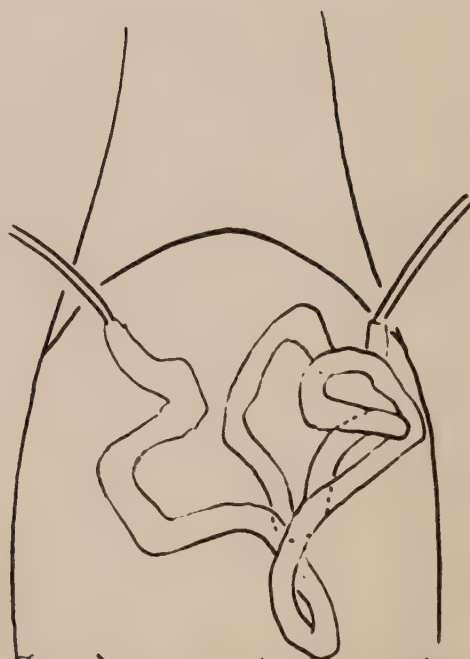
Hémorragie lors de l'injection de l'anesthésique ou par

Figure 5 : Visualisation par radiographie de la première anse de l'anse de Thiry-Vella double et permanente chez le rat



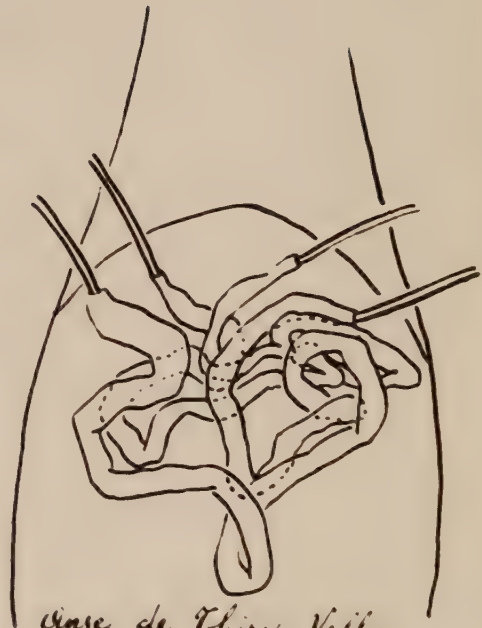
*Première anse de l'anse de
Thiry-Vella double et permanente*

Figure 6 : Visualisation par radiographie de la deuxième anse de l'anse deThiry-Vella double et permanente chez le rat



*Deuxième anse de l'anse de
Thiry-Vella double et permanente*

Figure 7 : Visualisation simultanée par radiographie des deux anses
de l'anse de Thiry-Vella double et permanente chez le rat



*Anse de Thiry Vella
double et permanente*

relâchement des points de ligature des terminaisons vasculaires .

Eventration évitée par la position avancée des abouchements dans la direction du thorax rendant leur accès difficile aux dents ou aux griffes de l'animal .

Obstructions des orifices de l'anse isolée par des sécrétions intestinales, soit par rapprochement de leurs lèvres mal écartées .

D-Technique de réalisation de l'anse de Thiry-Vella "permanente"double

L'anse de Thiry-Vella "permanente" et double comporte deux anses intestinales isolées de longueur 20 cm chacune . Le repérage et l'isolement des deux portions jéjunales adjacentes de l'anse de Thiry-Vella permanente et double est identique à celle du type "permanente" et simple .

Pour rétablir la continuité du tractus intestinal, l'anastomose intestino-intestinale est réalisée par la même technique opératoire . L'abouchement des orifices se fait toujours le plus près possible du cercle hypocondrial . Par rapport à l'opérateur, les orifices de la 1ère anse sont placés à droite et ceux de la 2ème anse à gauche .

Les soins post opératoires, les complications et les conditions d'utilisation n'ont pas d'autres particularités que celles concernant l'anse de Thiry-Vella "permanente" simple .

Le rat porteur de l'anse de Thiry-Vella "permanente" et double se prête parfaitement aux expériences de double perfusion . La visualisation par radiographie des anses ainsi isolées (fig. 5 , 6 et 7) montre leur aspect régulier et normal après plusieurs perfusions.

E-Utilisation des rats porteurs d'anse de Thiry-Vella "permanente"(fig. 8)

Le rat est anesthésié au Nembutal pour se prêter aux

Figure 8 : Perfusion d'une anse de Thiry-Vella double et permanente
chez le rat



expériences de perfusion . La fixation des canules souples de perfusion ou de récolte se fait par de simples pinces "crocodile" et ne nécessite pas d'appareillage compliqué comme dans le cas du chien (BUCHWALD 1964) .

L'anse de Thiry-Vella "permanente" réalisée chez le rat, présente non seulement l'avantage de pouvoir permettre la répétition des expériences sur le même animal mais aussi de constituer facilement des lots d'animaux plus homogènes que chez les grands espèces .

D'autre part, la méthode très simple d'anse de Thiry-Vella double "temporaire" ou "permanente", préconisée par nous, constitue un perfectionnement technique très appréciable . Elle permet d'étudier séparément par les 2 circuits indépendants de perfusion, chez le même animal, l'absorption de deux substances dont les interactions ne peuvent se réaliser dans ces conditions que par la voie sanguine .

II - DESCRIPTION D'UN PROTOCOLE TYPE DE PERFUSION .

L'absorption intestinale est étudiée par perfusion d'anse de Thiry-Vella de 20 cm de long avec une solution de glucose à 4 p. 100 et en circuit ouvert . Cette technique est très proche de celle de SÖLS et PONZ (104) . Le rat porteur d'une anse de Thiry-Vella "temporaire" ou "permanente" est anesthésié au Nembutal à 0,50 p. 100 par voie intrapéritonéale et à raison de 0,8 ml par kg de poids vif , fixé sur le dos et maintenu à une température de 28 à 30°C par la chaleur émanant d'une lampe électrique . L'anesthésie est renforcée toutes les 90 minutes par injection intrapéritonéale d'une demi-dose de Nembutal . La perfusion est pratiquée par une canule en polyvinyle de 1 mm de diamètre . La vitesse constante de perfusion de 4,5 ml par heure est assurée par une pompe continue type " UNITA IIB " à vitesse réglable . La canule à la sortie de la pompe traverse un bain-marie à 38°C avant d'être

introduite dans l'orifice en amont de l'anse de Thiry-Vella . Celle-ci est tout d'abord lavée à l'aide de la solution à perfuser pendant une minute à la vitesse de 300 ml par heure pour chasser les divers matériaux présents à l'intérieur de l'anse intestinale et pouvant obstruer la canule de sortie durant l'expérience, provoquer des changements de pression au niveau de la paroi intestinale, ce qui perturberait la régularité de l'absorption du glucose . On ramène ensuite la vitesse de la pompe à 4,5 ml par heure . Deux minutes après, le débit étant stabilisé, on adapte à l'orifice en aval une canule de 15 cm qui plonge dans un tube gradué de 5 ml contenant du fluorure de sodium pour inhiber instantanément la glycolyse dans le perfusat . Au moment où le liquide de perfusion atteint l'extrémité libre de la canule de sortie, on note le temps t_0 . Le volume du perfusat recueilli est lu directement sur le tube de récolte que l'on change toutes les heures et que l'on conserve à 4°C jusqu'au moment du dosage .

Fait intéressant le perfusat sort par pulsions régulières, indépendantes des mouvements respiratoires, traduisant un péristaltisme intestinal normal .

Chaque perfusion dure 4 heures . L'absorption intestinale est estimée par différence entre les quantités de glucose introduites dans l'anse intestinale, et celle récoltée à la sortie . Le glucose est déterminé par la méthode d'Hoffman adaptée à l'autoanalyseur (voir partie technique).

CHAPTITRE II

EFFET DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE SUR L'ABSORPTION DU GLUCOSE

I - Expression des résultats .

L'expression des résultats de l'absorption intestinale se rapporte à la longueur de l'intestin, mais l'obtention de cette longueur n'est pas conçue de la même façon par divers expérimentateurs . L'élasticité de l'intestin rend cette mesure imprécise . On préconise d'exercer une traction constante sur l'intestin pendant sa mesure (121) . Cependant, l'épaisseur de l'intestin chez les petits animaux peut varier du simple ^{donc} au double de 0,17 à 0,33 mm (131), la même longueur ne représente pas la même quantité de tissu . Ceci explique que VIDAL -SIVILLA, en comparant le taux d'absorption du glucose par segment intestinal mesuré avec ou sans traction, constate que les variations individuelles d'absorption sont un facteur beaucoup plus important .

Dans le cas de l'anse de Thiry-Vella où l'intestin possède son mésentère, l'élongation intestinale est limitée par la présence de ce mésentère non extensible . La mesure du segment intestinal choisi est donc suffisamment précise si on a soin de bien étaler au préalable l'intestin et le mésentère . Nous constatons que pour des rats de 250 à 350g, 20 cm d'intestin mesurés dans ces conditions représentent 1,4 g à 1,6 g de poids frais (13,3 p. 100 de variation) , les mesures sont effectuées après perfusion .

II - Similitude de l'absorption par des anses de Thiry-V.

Tableau I

ABSORPTION DE GLUCOSE CHEZ LES RATS PORTEURS D'UNE ANSE DE THIRY-VELLA
 "TEMPORAIRE" OU "PERMANENTE" (LONGUEUR = 20cm)

Glucose 4 p. 100 ; durée de perfusion 4 heures .

Le glucose absorbé est exprimé en mg par heure de perfusion . Chaque résultat est la moyenne des valeurs obtenues après chaque heure de perfusion .

n° des Rats	Anse temporaire	n° des Rats	Anse permanente
1	87,6	P ₁	97,3
2	93,6	P ₂	83,8
3	103,1	P ₃	106,3
4	100,5	P ₄	96,3
5	91,3	P ₅	92,0
6	87,4	P ₆	82,8
7	85,0	P ₇	92,5
8	98,5	P ₈	96,5
Moyenne	93,5	Moyenne	92,4
déviati on standard	+ 6,276	déviati on standard	+ 7,132

Ayant tenu compte de ces variations, nous avons voulu examiner si les différents types d'anse de Thiry-Vella "temporaire" et "permanente" présentent des variations d'absorption pour une même solution de glucose. Les résultats obtenus après 4 heures de perfusion sont rassemblés dans le tableau I, nous voyons qu'il n'y a pas de différence significative ($0,05 < p < 0,01$) entre les taux d'absorption de glucose par les deux types d'anses intestinales réalisées chez le rat. Nous pouvons conclure que les anses de Thiry-Vella "temporaires" et "permanentes" ont la même capacité d'absorption en présence d'une solution à 4 pour 100 de glucose (pour même durée et même longueur).

III - Détermination de la dose d'acide pantothénique à utiliser pour l'étude de son action sur l'absorption du glucose

A- Nous avons, dans les recherches préliminaires, déterminé l'influence de la concentration en acide pantothénique sur les variations de l'absorption du glucose. Pour cela, nous avons fait une série d'expériences en conservant les mêmes conditions expérimentales et en ajoutant à la solution de glucose des quantités croissantes d'acide pantothénique (pantothénate de Calcium, produit Roche) entre 0,5 mg par ml à 1,5 mg par ml. Nous avons constaté que l'absorption du glucose atteint sa valeur maximale et est plus régulière pour la dose de 1mg ou 2,09 micromoles par ml. (Tableau II).

B- La dose d'acide pantothénique utilisée (1 mg/ml) semble à première vue très élevée; mais il convient de se rappeler que la perfusion étant en circuit ouvert, l'acide pantothénique présent dans la lumière intestinale ne peut être totalement utilisé. D'autre part, chez le rat, les doses d'acide pantothénique peuvent être beaucoup plus élevées, car chez cette espèce la DL 50 de l'acide pantothénique par voie sous cutanée est de 3,4 g/kg (UNA et GRESLIN). Pendant 4 heures de perfusion, nous avons administré au rat 18 mg d'acide pantothénique représentant seulement le 1/10 et même le 1/140 des doses utilisées par UNA et GRESLIN pour

Tableau II

ABSORPTION DE GLUCOSE EN PRESENCE DE DIFFERENTES DOSES D'ACIDE PANTOTHENIQUE CHEZ LES RATS PORTEURS D'UNE ANSE DE THIRY-VELLA "TEMPORAIRE"
(LONGUEUR = 20 cm)

Glucose 4 p. 100 ; acide pantothénique 0,5 mg, 0,75 mg, 1 mg et 1,5 mg par ml ; durée de perfusion 4 heures . Le glucose absorbé est exprimé en mg par heure de perfusion . Chaque résultat est la moyenne des valeurs obtenues après chaque heure de perfusion .

	Concentration en acide pantothénique du perfusé			
	0,5mg par ml	0,75mg par ml	1mg par ml	1,5mg par ml
	85	120	147,6	124
	100	106	120,4	98
	90	92,5	114,3	90
	105	106	128	100
	102,5	90	104,9	96,2
	-	95	122,3	87,5
	-	-	130,0	-
	-	-	115,0	-
Moyenne	96,5	101,6	122,8	99,3
Déviati on standard	$\pm 7,681$	$\pm 10,314$	$\pm 12,007$	$\pm 11,885$

Tableau III

ABSORPTION DE GLUCOSE SEUL OU EN PRESENCE D'ACIDE PANTOTHENIQUE CHEZ
LES RATS PORTEURS D'ANSE DE THIERY-VEILLA "TEMPORAIRE" (LONGUEUR=20cm)

Glucose 4 p. 100 ; Acide pantothénique 1mg ou 2,09 micromoles par ml ;
durée de perfusion 4 heures . Le glucose absorbé est exprimé en mg
par heure de perfusion . Chaque résultat est la moyenne des valeurs
obtenues après chaque heure de perfusion .

n° des Rats	Absorption sans acide pantothénique (1)	n° des Rats	Absorption en présence d'acide pantothénique(2)
1	87,6	9	147,6
2	93,6	10	120,4
3	103,1	11	114,3
4	100,5	12	128,0
5	91,3	13	104,9
6	87,4	14	122,3
7	85,0	15	130,0
8	98,5	16	115,0
Moyenne	95,5	Moyenne	122,8
déviatiion	$\pm 6,276$	déviatiion	$\pm 12,007$
standard		standard	

tester la tolérance à cette vitamine chez le rat . En effet, ils ont administré par voie buccale 200 mg d'acide pantothénique par jour et par rat pendant 190 jours sans que le développement des rats expérimentés en soit perturbé . Ils ont même augmenté la dose jusqu'à 10 g par kg de poids vif sans provoquer d'effet pathologique .

Nous avons donc adopté la dose de 1 mg par ml ou 2,09 micromoles par ml pour étudier l'influence de l'acide pantothénique sur l'absorption du glucose par le type d'anse de Thiry-Vella réalisée .

C- Dans l'anse "temporaire" une seule perfusion peut être réalisée sur le même rat . Nous avons donc dû déterminer l'absorption du glucose (d'heure en heure) sur deux séries d'animaux sans ou avec adjonction d'acide pantothénique . C'est pourquoi ici on peut seulement calculer la moyenne des absorptions dans les deux cas .

Les résultats rassemblés dans le tableau III montrent qu'en moyenne l'augmentation est de 30 pour 100.

D- Avec l'anse "permanente", nous pouvons pratiquer deux expériences sur le même animal : perfusion avec une solution de glucose puis de glucose + acide pantothénique . Il faut que les deux perfusions soient séparées par 3 à 8 jours . Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau IV .

a) On constate que l'absorption du glucose seul est tout à fait semblable chez les rats porteurs d'une anse "temporaire" ou "permanente" .

b) Mais l'effet activateur de l'acide pantothénique sur l'absorption du glucose est moins prononcé (25 pour 100) et diffère selon le rat dans de larges proportions de 10,8 à 42 pour 100 . Ces différences sont indépendantes de l'ordre avec lequel on perfuse l'anse permanente soit d'abord avec une solution de glucose, soit avec une solution de glucose + acide pantothénique .

Nous avons pensé que l'acide pantothénique ajouté dans cette anse permanente était retenue par la muqueuse de façon variable en

Tableau IV

ABSORPTION DE GLUCOSE SEUL OU EN PRESENCE DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE CHEZ
UN RAT PORTEUR D'UNE ANSE DE THIRY-VELLA "PERMANENTE " (LONGUEUR = 20 cm)

Glucose 4 p. 100 ; Acide pantothenique 1 mg ou 2,09 micromoles par ml ;
durée de perfusion 4 heures . Le glucose absorbé est exprimé en mg par
heure de perfusion . Chaque résultat est la moyenne des valeurs obtenues
après chaque heure de perfusion .

N° des Rats	Absorption sans acide pantothenique (1).	Absorption en présence d'acide pantothenique (2,09 μ M/ml) (2)	Pourcentage d'augmentation
P ₁	97,3	117,5	20,72
P ₂	83,8	105,5	25,89
P ₃	106,3	150,3	41,39
P ₄	96,3	115,0	19,42
P ₅	92,0	114,3	24,24
P ₆	82,8	117,6	42,03
P ₇	92,5	102,5	10,81
P ₈	96,5	121,8	26,22
Moyenne	93,44	118,1	26,33
déviati on standard	$\pm$ 7,132	$\pm$ 13,589	$\pm$ 9,987

Pour chaque rat, l'intervalle entre deux perfusions successives est de 3 jours à une semaine .

rapport avec le temps écoulé depuis l'intervention (en moyenne deux semaines) et l'état de perméabilité des orifices de l'anse "permanente" . En effet, les sécrétions intestinales continuent à se faire, preuve du fonctionnement de l'anse, et s'évacuent par l'orifice en aval . Selon la durée de leur rétention, ces produits imprégneraient plus ou moins profondément la muqueuse et modifieraient son fonctionnement .

CHAPITRE III

SPECIFICITE DE L'ACTION DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE SUR L'ABSORPTION DU GLUCOSE

En perfusant du glucose en présence d'acide pantothénique chez le rat normal, nous avons donc pu observer une augmentation de l'absorption du glucose . Cet effet activateur est-il spécifique de l'acide pantothénique ? Pour répondre à cette question, nous avons étudié l'absorption du glucose en présence de quelques vitamines dont les effets biologiques et le mode d'absorption intestinale permettaient de faire des rapprochements avec l'acide pantothénique .

I ETUDE COMPAREE DE QUELQUES VITAMINES HYDROSOLUBLES .

Il convient de remarquer que l'absorption des vitamines hydrosolubles est peu connue en dehors de celle de l'acide folique et de la vitamine B₁₂ . Il semble qu'en dépit de leur importance dans les divers métabolismes intermédiaires, ce qui aurait conduit à supposer une régulation de leur absorption par intervention d'un mécanisme de transport^{actif}, en réalité, la pyridoxine (BRAIN et BOOTH 1964), l'acide ascorbique (SMITH et TAYLOR, SPENCER et coll.) et l'acide pantothénique (TURNER et HUMES, SPENCER et BOW) sont rapidement absorbés par la partie proximale de l'intestin grêle chez le rat et chez l'homme . La relation linéaire entre la dose et l'absorption "in vivo" aussi bien qu'"in vitro" de ces vitamines montre qu'il s'agit d'une simple diffusion, d'une absorption passive .

D'une part, l'action indiscutable de la pyridoxine sur la pénétration cellulaire des acides aminés (1), (39), (52), nutriments dont l'absorption est souvent étudiée en présence de glucose (48) (81), et d'autre part l'effet bien connu de l'acide ascorbique signalée en 1955 par T. TEBROINE, et qui, d'après cet auteur, peut dans un régime totalement carencé en acide pantothénique remplacer cette vitamine, ont attiré notre attention sur leurs possibilités de modifier l'absorption intestinale du glucose d'un perfusé, par leur présence simultanée avec ce nutriment dans la lumière intestinale .

Ces deux vitamines, comme l'acide pantothénique, provoquent par leur carence des perturbations du mécanisme de formation des anticorps (AXELOR, GITIER, SPENCER) . Par ailleurs, ce sont les seules vitamines hydrosolubles qui du fait de leur structure chimique peuvent former des lactones internes . L'existence de ces analogies entre les 5 vitamines nous incitait à rechercher si toutes les trois interviennent dans l'absorption du glucose ou si l'action de l'acide pantothénique est spécifique de cette seule vitamine .

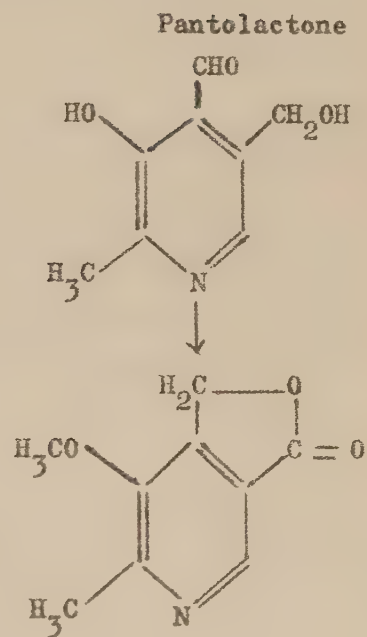
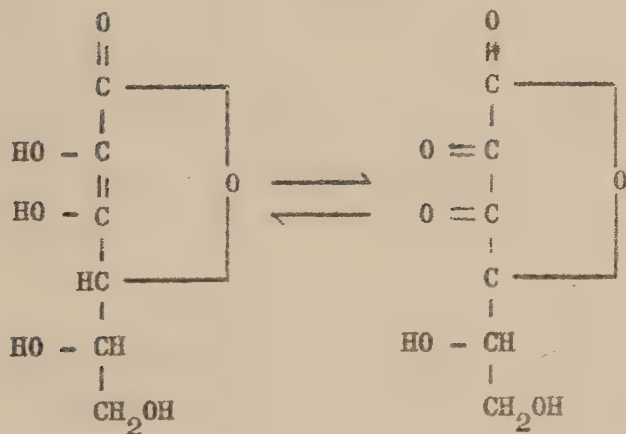
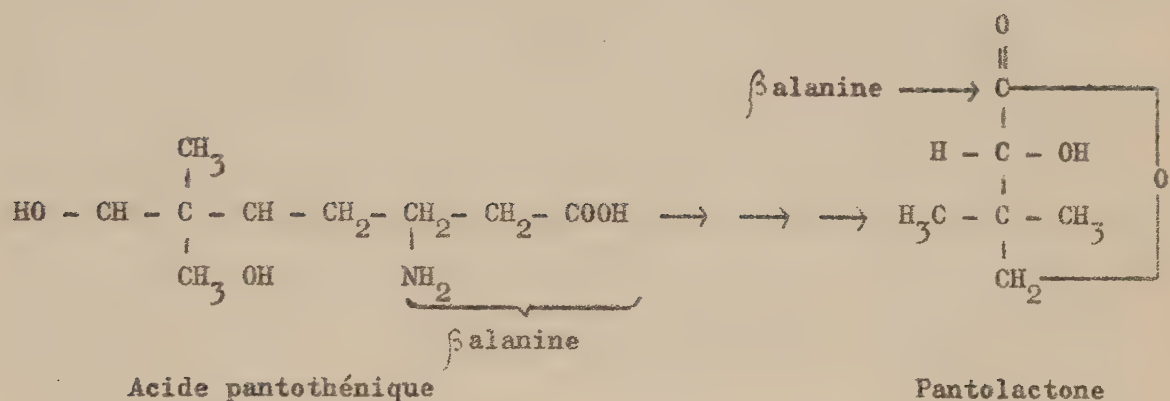
Conditions expérimentales .

Dans les expériences qui suivent, nous utilisons l'acide ascorbique (Produit Spécia) et la pyridoxine (Produit Sigma) à la même dose que l'acide pantothénique (2,09 micromoles par ml de solution de glucose perfusée) . La perfusion d'une solution de glucose en présence de chacune des vitamines chez les rats porteurs d'une anse de Thiry-Vella "temporaire" se fait en circuit ouvert dans les mêmes conditions que précédemment . Le glucose est dosé suivant la méthode d'HOFFMAN adaptée à l'autolyseur Technicon .

Résultats et discussions

Les résultats des deux séries d'expériences concernant

Fig. 9 : Structure des lactones formés à partir de l'acide pantothénique, acide ascorbique et pyridoxine .



l'influence de l'acide ascorbique et de la pyridoxine sur l'absorption du glucose sont réunis dans le tableau V .

L'acide ascorbique ne modifie pas l'absorption du glucose qui reste la même que lors de la perfusion d'une solution de glucose seul (cf. tableau I) . L'acide ascorbique ne peut donc remplacer l'acide pantothénique pour accélérer le transport actif du glucose . Une intervention éventuelle de cette vitamine, dont le groupement diène-one (fig. 9) lui confère un rôle bien défini dans les systèmes d'oxydo-réduction, aurait pu nous renseigner sur le mode d'action de l'acide pantothénique qui serait de maintenir indirectement par son dérivé biologique, le coenzyme A, le niveau d'oxydo-réduction ^{du} système cellulaire (ROBBINS et coll. 95) . L'importance de l'oxygénation cellulaire au niveau de la paroi intestinale est liée à l'intensité de la glycolyse aérobie de ce tissu (4) donc à la production de l'énergie nécessaire au transport actif .

L'action de la pyridoxine est par contre nettement dépressive sur l'absorption du glucose (Tableau V) . Remarquons que sa carence provoque chez le rat un faible niveau d'absorption des acides aminés (AKEDO, FRIEDLANDER) et aussi de celle du glucose (ALTHAUSEN et coll.) . Il s'agirait là d'effets nutritionnels très complexes plutôt que d'une intervention spécifique (inhibition) au niveau du transport actif du glucose .

L'inhibition partielle par la pyridoxine de l'absorption du glucose dans nos conditions expérimentales suggère une autre hypothèse . On pourrait penser à une compétition entre l'acide pantothénique et la pyridoxine pour une fixation sur un des sites actifs du système transporteur du glucose . L'encombrement stérique de la pyridoxine affecterait la mobilité de ce système et réduirait le taux d'absorption . On constate d'autre part que l'acide pantothénique n'agit pas par un simple effet ionique ; son mécanisme d'action semble être différent et plus complexe . Les trois vitamines étudiées sont introduites dans

Tableau V

ABSORPTION DE GLUCOSE PAR L'ANSE DE THIRY-VELLA "TEMPORAIRE"

(LONGUEUR = 20 cm) EN PRESENCE DE L'ACIDE ASCORBIQUE OU DE LA PYRIDOXINE .

Glucose 4 p. 100, acide ascorbique 2,09 $\mu\text{M}/\text{ml}$; pyridoxine 2,09 $\mu\text{M}/\text{ml}$.

Perfusion de 4 heures . Le glucose est exprimé en mg par heure de perfusion

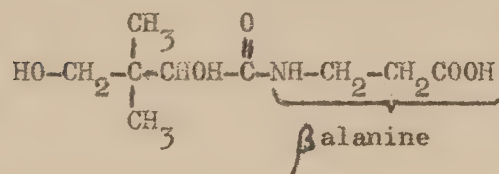
n° des Rats	Absorption de gluco- se en présence d'aci- de ascorbique	n° des Rats	Absorption de gluco- se en présence de pyridoxine
21	90,3	27	78,3
22	85,4	28	75,4
23	82,1	29	81,5
24	89,5	30	79,6
25	87,2	31	85,2
26	96,0	32	70,1
Moyenne	90,1		78,4
Déviatiion standard	$\pm 5,350$		$\pm 4,746$

l'intestin à la même concentration, seul l'acide pantothénique augmente l'absorption du glucose . Ce phénomène est d'autant plus significatif que le cation Ca^{++} présent dans le pantothénate utilisé tendrait à diminuer plutôt l'absorption intestinale (QUASTEL (90)).

En résumé, tous ces faits sont fortement en faveur de l'influence propre, spécifique de l'acide pantothénique sur l'absorption du glucose .

II - CONSTITUANT ET FONCTION DE LA MOLECULE RESPONSABLES DE L'ACTIVITE DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE

Formule de l'acide pantothénique :



Nous allons maintenant examiner d'une part quel est le constituant de cette vitamine qui intervient dans l'activation de l'absorption et d'autre part si certains des ses dérivés sont également actifs .

A - Influence de la β alanine .

Dans la molécule d'acide pantothénique, le constituant possédant une signification nutritionnelle reconnue est la β alanine . Elle peut remplacer l'acide pantothénique chez certaines bactéries qui à partir de cet amino-acide le synthétise, autrement dit le besoin en acide pantothénique peut être couvert par cet acide aminé . Chez les

Tableau VI

ABSORPTION DE GLUCOSE EN PRESENCE DE β ALANINE CHEZ LES RATS PORTEURS
D'UNE ANSE DE THIERY-VELLA "TEMPORAIRE" (LONGUEUR = 20 cm) .

Glucose 4 p. 100 . Perfusion de 4 heures . Les quantités de glucose
absorbé sont exprimées en mg par heure de perfusion .

n° des Rats	Absorption de glucose en pré- sence de 1 μ M/ml de β alanine	n° des Rats	Absorption de glucose en pré- sence de 2 μ M/ml de β alanine	n° des Rats	Absorption de glucose en pré - sence de 3 μ M/ml de β alanine
33	92,4	40	104	46	108,7
34	139,6	41	104	47	106,5
35	110,4	42	96	48	128,2
36	75,7	43	112	49	99,6
37	83,4	44	92	50	98,7
38	104,5	45	103	51	102,3
39	83	-	-	-	-
Moyenne 98,5		103		107,3	
Déviation $\pm$ 20,54 standard		$\pm$ 6,388		$\pm$ 9,981	

animaux supérieurs, la β alanine ne peut permettre la synthèse d'acide pantothénique et ne se rencontre d'ailleurs pas à l'état d'acide aminé libre . Nous avons examiné ses effets .

1 - Conditions expérimentales .

L'anse de Thiry-Vella est de type "temporaire" . La perfusion, en circuit ouvert, est pratiquée dans les mêmes conditions que précédemment . La β alanine (Produit Sigma) est ajoutée à la solution de glucose à 3 concentrations : 1 micromole, 2 micromoles et 3 micromoles par ml .

2 - Résultats et discussion.

La β alanine ajoutée au perfusat ne modifie pas l'absorption du glucose, même à la concentration optimale pour l'acide pantothénique (Tableau VI) . Elle ne rentre pas en compétition avec le glucose au niveau du transport actif comme cela a lieu pour la plupart des amino acides (GIBSON et coll. (41), HINDMARSH et coll. (48), NEWBY et coll. (81)) .

L'absorption du glucose n'est donc pas influencée de façon significative par la présence de β alanine introduite à l'état d'acide aminé en solution dans la lumière intestinale .

Nous avons fait des essais analogues avec la deuxième partie constitutive de la molécule d'acide pantothénique à savoir le α , γ dihydroxy β , β diméthyl butyryl et constaté qu'il est sans effet sur l'absorption .

B - Influence du panthénol

Quelle est la forme active de l'acide pantothénique ? L'étude des dérivés susceptibles de le remplacer dans certaines conditions pourrait nous préciser le groupement chimique agissant sur l'absorption

Tableau VII

ABSORPTION DE GLUCOSE EN PRESENCE DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE
PANTHENOL CHEZ LES RATS PORTEURS D'UNE ANSE DE THIRY-VELLA "TEMPORAIRE"
(LONGUEUR = 20 cm) .

Glucose 4 p. 100 . Perfusion de 4 heures . Les quantités de glucose
absorbé sont exprimées en mg par heure de perfusion .

n° des Rats	Glucose + Panthénol 1 μ M/ml	n° des Rats	Glucose + Panthénol 2 μ M/ml	n° des Rats	Glucose + Panthénol 3 μ M/ml
52	92,5	57	97,5	62	100
53	99,5	58	96,8	63	98,8
54	99,8	59	102,5	64	90
55	101,3	60	100	65	96,8
56	92	61	92,5	66	100,5
Moyenne	97,02		97,86		97,22
Déviati on standard	$\pm$ 3,945		$\pm$ 3,349		$\pm$ 3,828

du glucose . Le panthénol à ce titre est intéressant pour plusieurs raisons . Il ne diffère de l'acide pantothénique que par un groupement alcoyle au lieu d'un groupement carboxyle . Chez les animaux supérieurs, le panthénol remplace efficacement l'acide pantothénique en thérapeutique (PFALTZ), et on admet même qu'il est mieux métabolisé par les organismes inférieurs que l'acide pantothénique . Il a donc paru intéressant de rechercher son action sur l'absorption du glucose .

1 - Conditions expérimentales .

L'influence du panthénol sur l'absorption du glucose est étudiée chez les rats porteurs d'une anse de Thiry-Vella "temporaire" . Le panthénol (Produit Roche) est ajouté à la solution de glucose à 3 concentrations : 1 μ M, 2 μ M et 3 μ M par ml .

2 - Résultats et discussions .

Les quantités de glucose absorbé en présence de différentes concentrations de panthénol sont groupés dans le tableau VII . On constate que l'absorption reste normale et très régulière . Le panthénol qui diffère de l'acide pantothénique par son groupement alcoyle n'agit donc pas sur le transport actif du glucose . On peut conclure que la présence de la fonction carboxylique est indispensable à la propriété d'activation observée pour l'acide pantothénique . L'importance de cette fonction carboxylique se manifeste aussi chez les microorganismes . Ainsi le panthénol ne peut se substituer à l'acide pantothénique comme facteur de croissance du *Lactobacillus plantarum* (DRELL et DUNN, 35) . Probablement l'enzyme qui catalyse l'oxydation du groupement alcoyle du panthénol en groupement carboxyle du pantothénate devrait faire défaut chez ce micro-organisme . Il est certain que la densité électronique apportée par le radical -OH augmente la polarisation δ^+ du carbone carboxylique

et rend le pantothénate plus réactif pour former l'acide 4'phospho-pantothénique, étape importante dans la synthèse du coenzyme A .

La réactivité du pantothénate en raison de sa forme acide expliquerait son action spécifique sur le système transporteur du glucose .

CHAPITRE IV

CARACTERISTIQUES DE L'ACTION DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE SUR L'ABSORPTION INTESTINALE DU GLUCOSE

Nous avons vu que l'acide pantothenique ajouté au perfusat augmente l'absorption du glucose de façon spécifique et par un effet non ionique . L'anse de Thiry-Vella ayant conservé ses connexions vasculaires avec l'organisme, permet à l'acide pantothenique une fois absorbé d'atteindre les autres parties du corps par la circulation sanguine . Dans ces conditions, l'acide pantothenique introduit dans une anse intestinale isolée pourrait - il exercer une activation sur l'absorption du glucose dans les autres parties de l'intestin grêle . L'existence d'un tel phénomène suppose que l'acide pantothenique traverse la paroi intestinale sous une forme active , suffisamment stable et non immédiatement métabolisé au niveau du foie, ou qu'il exerce le même effet activateur en pénétrant dans la cellule indifféremment par le côté muqueux ou le côté séreux .

I - Mise en évidence d'une action locale et "in situ" de l'acide pantothenique .

Pour se rendre compte si l'acide pantothenique absorbé par une anse isolée peut agir sur le reste de l'intestin, on doit pouvoir comparer, chez le même animal, les niveaux d'absorption simultanée de glucose en présence ou en absence d'acide pantothenique dans deux anses intestinales . Nous avons réalisé dans ce but l'anse de Thiry-

Tableau VIII

PERFUSION SIMULTANÉE CHEZ LE MÊME RAT DE DEUX ANSES DE THIRY-VELLA
 "PERMANENTE" AVEC UNE SOLUTION DE GLUCOSE (LONGUEUR DE CHAQUE
 ANSE = 20 cm) .

Glucose 4 pour 100, perfusion de 4 heures . Le glucose absorbé est
 exprimé en mg par heure de perfusion . Chaque résultat est la moyenne
 des valeurs obtenues après chaque heure de perfusion .

n° des Rats	Absorption de glucose par la 1ère anse	Absorption de glucose par la 2e anse
D ₁	105,0	97,5
D ₂	98,8	106,3
D ₃	101,3	95,0
D ₄	113,8	102,5
D ₅	105,0	107,5
D ₆	111,3	99,5
Moyenne	105,9	101,4
Déviatiion standard	$\pm 5,241$	$\pm 4,514$

Tableau IX

PERFUSION SIMULTANÉE CHEZ LE MÊME RAT DE DEUX ANSES DE TUBES-VEILLA
 "PERMANENTE" AVEC UNE SOLUTION DE GLUCOSE + ACIDE PANTOTHÉNIQUE .
 (LONGUEUR DE CHAQUE ANSE = 20 cm) .

Glucose 4 pour 100, acide pantothenique 2,09 micromoles par ml,
 perfusion de 4 heures . Le glucose absorbé est exprimé en mg par
 heure de perfusion . Chaque résultat est la moyenne des valeurs
 obtenues après chaque heure de perfusion .

n° des Rats	Absorption de glucose par la 1 ^{ère} anse (en présen- ce d'acide pantothenique)	Absorption de glucose par la 2 ^e anse (en présence d'acide pantothenique)
D ₁	136,5	127,5
D ₂	141,8	142,5
D ₃	123,8	137,5
D ₄	140,0	127,5
D ₅	122,5	112,5
D ₆	130,0	135,0
Moyenne	132,4	130,4
Déviati on standard	+ 7,536	+ 9,620

Vella double qui nous permet de perfuser chez le même animal, par des circuits séparés et indépendants deux anses intestinales n'ayant entre elles d'autres contacts que les connexions vasculaires . Ceci répond parfaitement aux exigences de nos expériences . Certes, on peut aussi perfuser l'anse de Thiry-Vella simple avec une solution de glucose et introduire en même temps par tube gastrique de l'acide pantothénique . Mais dans ces conditions, il existe des variations dues au transit gastrointestinal et à l'action des sucs digestifs .

Conditions expérimentales .

Nous rappelons brièvement les détails anatomiques de l'anse de Thiry-Vella double : le 1er segment intestinal représente 20 cm de la partie haute du jéjunum et le 2e, 20 cm de la partie adjacente ; la technique de réalisation a été décrite dans le chapitre I . Dans une première série d'expériences, nous avons perfusé l'anse double avec une même solution soit de glucose seul à 4 p. 100, soit de glucose 4 p. 100 + acide pantothénique (1 mg/ml) . Ensuite dans une deuxième série, la première anse est perfusée avec une solution à 4 p. 100 de glucose et la deuxième avec la même solution additionnée d'acide pantothénique .

Résultats et discussions .

Les résultats concernant la perfusion de l'anse double avec une même solution sont rassemblés dans les tableaux VIII et IX.

1 - On constate que l'absorption du glucose par les deux anses sont identiques (Tableau VIII) .

2 - Lorsqu'on ajoute de l'acide pantothénique à la solution de glucose à perfuser, l'augmentation d'absorption du glucose se produit de façon analogue dans les deux anses (Tableau IX) .

Ces observations nous ont amené à conclure que les portions

Tableau X

PERFUSION SIMULTANÉE CHEZ LE MÊME RAT DE LA 1^{ère} ANSE DE THIRY-VEILA
PERMANENTE AVEC DU GLUCOSE ET DE LA 2^e ANSE AVEC DU GLUCOSE + ACIDE
PANTOTHÉNIQUE . (LONGUEUR DE CHAQUE ANSE = 20 cm) .

Glucose 4 pour 100, acide pantothénique 2,09 micromoles par ml, per-
fusion de 4 heures . Le glucose absorbé est exprimé en mg par heure
de perfusion . Chaque résultat est la moyenne des valeurs obtenues
après chaque heure de perfusion .

n° des Rats	Absorption du glucose par la 1 ^{ère} anse (sans acide pantothénique)	Absorption du glucose par la 2 ^e anse (en présence d'acide pantothénique)
D ₁	109,5	131,8
D ₂	100,0	145,8
D ₃	114,3	146,8
D ₄	115,5	122,0
D ₅	102,8	116,0
D ₆	116,3	120,8
Moyenne	109,7	130,4
Déviati on standard	± 6,326	±12,208

haute et basse du jéjunum présentent le même niveau d'absorption de glucose et qu'elles répondent de la même façon à l'acide pantothénique. Nous pouvons donc comparer l'absorption du glucose par ces deux anses en faisant varier la composition du contenu de l'une d'elles si le facteur étudié provoque le même effet au niveau de ces deux anses .

3 - Ainsi, lorsqu'on maintient chez le même rat la perfusion d'une solution de glucose dans la première anse et qu'on introduit dans la deuxième une solution glucose + acide pantothénique, seule l'absorption de la 2e anse est augmentée tandis que celle de la 1ère n'est pas modifiée . (Tableau X) . L'action de l'acide pantothénique reste bien localisée à l'anse où il est introduit .

Il est certain que si l'acide pantothénique avait agi sur l'absorption intestinale par une action générale et par l'intermédiaire de la circulation sanguine, on aurait observé une augmentation d'absorption de glucose dans la première anse, car la durée de la perfusion est suffisamment longue (4 heures) pour permettre à l'acide pantothénique de se répandre dans tout l'organisme et par diffusion passive de pénétrer dans les entérocytes par le côté séreux au niveau de la première anse .

De ces résultats, nous pouvons retenir que l'acide pantothénique active l'absorption du glucose par une action locale s'exerçant "in situ" sur le côté muqueux de l'intestin .

II Durée d'action de l'acide pantothénique .

Nous avons constaté que l'acide pantothénique agit par un effet intraluminal sur l'absorption du glucose . Cet effet neut - il persister après la disparition de l'acide pantothénique de la lumière intestinale . L'acide pantothénique pourrait soit modifier dans ce cas

Tableau XI

DURÉE D'ACTION DE L'ACIDE PANTOTHÉNIQUE SUR L'ABSORPTION INTESTINALE
DU GLUCOSE . (ANSE DE THIRY-VELLA "PERMANENTE" L=10 cm) .

Glucose 4 pour 100, acide pantothénique 2,09 micromoles par ml . Le glucose absorbé est exprimé en mg par heure de perfusion . Le rat porteur d'une anse de Thiry-Vella "permanente" subit une première perfusion témoin de 4 heures avec une solution de glucose . Après repos d'une semaine, il subit une perfusion alternée de deux heures en deux heures avec d'abord une solution de glucose + acide pantothénique puis avec une solution de glucose seul .

n° des Rats	Perfusion té- moin simple : glucose seul (4 h) (1)	Perfusion alternée		Pourcentage d'augmentation de (2) à (3)
		Glucose + acide panto- thénique(2 h) (2)	glucose seul (2 h) (3)	
P ₁₀	97,0	127,0	95,2	33,4
P ₁₁	89,9	129,4	92,0	40,7
P ₁₂	100,0	142,6	98,0	45,5
P ₁₃	92,5	130,0	87,4	48,7
P ₁₄	94,6	128,3	98,5	30,3
P ₁₅	98,0	125,0	102,0	22,5
P ₁₆	90,3	124,5	93,2	33,6
Moyenne	94,6	129,5	95,2	36,38%
Déviation standard	± 3,617	± 5,670	± 4,473	± 8,450

de façon permanente la vitesse d'absorption soit agir temporairement sur le système transporteur .

Conditions expérimentales .

Nous utilisons des rats porteurs d'une anse de Thiry-Vella "simple" et permanente . Dans une première série d'expériences, nous déterminons, par la même technique de perfusion, le niveau d'absorption de glucose des différentes anses "permanentes" pour avoir le taux moyen d'absorption de glucose sans acide pantothénique . Dans une deuxième série d'expériences, ces anses sont perfusées successivement de deux heures en deux heures d'abord avec une solution de glucose additionné d'acide pantothénique puis avec une solution de glucose seul .

L'intervalle d'utilisation des rats entre la perfusion de contrôle et la perfusion alternée est de 4 à 7 jours .

Résultats et discussion .

Après avoir remplacé la première solution de glucose + acide pantothénique par une solution de glucose seul dans l'expérience de perfusion alternée, on constate que le niveau d'absorption du glucose redevient normal et identique à celui de la perfusion de contrôle . L'activation par l'acide pantothénique sur l'absorption du glucose disparaît dès la suppression de cet acide dans le perfusat . (Tableau XI) . Ce phénomène est dû à ce que l'absorption intestinale de l'acide pantothénique lui même se fait par un processus de diffusion passive (TURNER et coll. 1962, SPENCER et coll. 1964) dont la vitesse est fonction de la concentration intraluminaire en cet acide . Sa teneur devrait atteindre rapidement une répartition d'effet optimal sur l'absorption du glucose et correspondant à la vitesse de son passage à travers la paroi intestinale .

L'absence d'acide pantothénique dans le perfusat contribue ainsi à le faire disparaître rapidement de la paroi intestinale .

Ces constatations nous ont permis de conclure que l'acide pantothénique agirait "in situ" sur l'absorption du glucose sous une forme labile dont la concentration active est maintenue par l'apport continu d'acide pantothénique par le perfusat .

III - Action immédiate de l'acide pantothénique sur l'absorption intestinale du glucose

Ayant constaté l'effet fugace de l'acide pantothénique sur l'absorption intestinale, il nous a paru intéressant d'examiner si cette vitamine n'agit qu'après un certain temps de latence . Le problème consiste donc à pouvoir apprécier rapidement le niveau d'absorption du glucose après adjonction d'acide pantothénique dans le perfusat . Pour cela, nous avons déterminé la glycémie à partir du sang provenant d'une veinule mésentérique drainant le sang d'une portion de l'anse intestinale en expérience . Dans ces conditions, la glycémie traduit " qualitativement " le niveau d'absorption intestinale du glucose et permet de rendre compte immédiatement de toute variation d'absorption du glucose .

L'idée de récolter le sang ayant irrigué l'intestin et véhiculé le glucose absorbé avant son passage à travers le foie avait été exploitée avant nous par KIYASU et CHAIKOF en 1957 . Ils avaient introduit du glucose marqué dans une anse intestinale et pratiqué une ponction de la veine mésentérique principale pour récolter tout le sang pendant un temps déterminé ; la perte sanguine très importante avait été compensée par une transfusion à la veine jugulaire avec le même volume de sang prélevé sur un autre rat . Cette expérience représente un véritable drainage de l'organisme si l'on se réfère aux travaux de BOSS et coll. (1966) concernant l'hémodynamie de l'artère mésentérique supérieure dont le débit moyen pour un rat

de 500 g est de $10,9 \text{ ml} \pm 1,0$ à la minute . D'autre part, les résultats de l'expérience de KIYASU et CHAIKOF donnent des valeurs globales de l'absorption en fin de l'expérience sans précision sur l'évolution de ces valeurs . Ils ont toutefois le mérite de préciser la participation du glucose absorbé aux différents métabolismes de la paroi intestinale .

Conditions expérimentales

Nous déterminons en flux continu la glycémie par la méthode d'HOFFMAN adaptée à l'autoanalyseur . L'anse de Thiry-Vella "temporaire" est réalisée suivant la technique habituelle . Pour assurer l'hémostase, on pratique dès l'ouverture de la cavité abdominale un surjet serré sur tout le pourtour de la plaie qui restera ouverte .

Puis on met en place au niveau de la jugulaire deux cathéters dont celui situé au bout céphalique permet des prises de sang pour estimer la glycémie de l'animal, et celui situé vers l'extrémité cardiaque sert à la transfusion compensatrice pendant le prélèvement continu de sang de la veinule mésentérique .

On injecte 250 unités d'héparine (Choay) puis 2 à 3 minutes après, on détermine la glycémie de l'animal par le cathéter à l'extrémité céphalique de la jugulaire .

On extériorise l'anse intestinale et on l'étale soigneusement sur de la gaze vers le côté gauche de l'opérateur pour mettre en évidence la veinule choisie pour prélever le sang . On établit alors la perfusion intestinale et on procède au cathétérisme de cette veinule . Le cathéter utilisé (PE 10 - Adams) est préalablement hépariné et relié au tube de prélèvement de l'autoanalyseur . L'extrémité libre taillée en biseau court est tenue par des pinces droites . On l'approche de la veinule par le côté et on l'y introduit d'un mouvement sec et limité de telle manière qu'elle ne lèse pas la paroi opposée . Notons que l'apparition d'un hématome si petit soit - il est nuisible à l'expérience . Si le cathétérisme est bien fait, le

Figure 10 - Mise en place au niveau d'une veinule mésentérique du cathéter de prélèvement sanguin chez le rat.



sang aspiré par la pompe de l'autoanalyseur remonte immédiatement (Fig. 10) dans le cathéter et pénètre dans le circuit d'analyse dont l'enregistreur donne le résultat 7 minutes après . Le sang est prélevé à la vitesse constante de 0,9 ml à l'heure . Cette perte sanguine est compensée par une transfusion de même débit du sang artériel d'un animal donneur mis à jeûn et hépariné dans les mêmes conditions expérimentales .

Résultats et discussions.

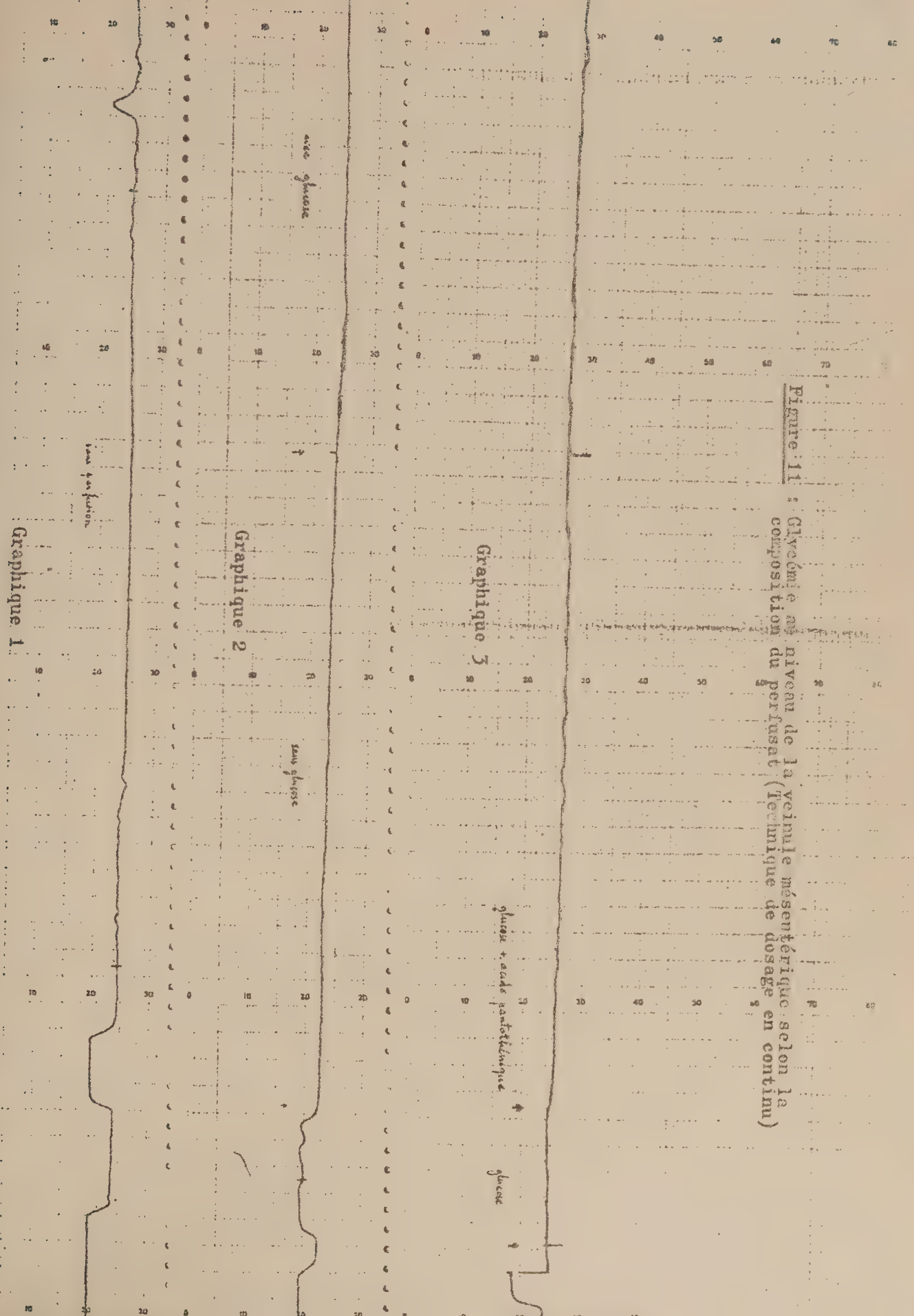
Les graphiques représentant les différentes courbes glycémiques sont réunis dans la figure : 11 .

1 - Lorsque l'animal est maintenu sous anesthésie et qu'il subit simultanément un prélèvement sanguin au niveau mésentérique et une transfusion compensatrice à la jugulaire, la glycémie de la veinule mésentérique efférente de l'anse de Thiry-Vella au repos, est constante. Dans nos conditions expérimentales, la glycémie au niveau d'une collatérale de la veine mésentérique ne varie donc pas en dehors de la période de perfusion . (Graphique 1) .

2 - La perfusion d'une solution de glucose à 4 p. 100 fait augmenter cette glycémie qui atteint un niveau supérieur traduisant l'absorption intestinale du glucose . La courbe glycémique enregistrée présente un nouveau palier correspondant aux activités optimales d'absorption des entérocytes en présence de cette solution de glucose (Graphique 2) .

3 - Lorsqu'on ajoute de l'acide pantothénique (2,09 micromoles par ml) au perfusé, l'absorption du glucose augmente . Sur le graphique 3, on observe un second palier plus élevé bien distinct du premier . Une comparaison entre le moment d'adjonction d'acide pantothénique et la réponse de l'enregistreur montre que l'activation de

Figure 11 : Glycémie au niveau de la veine mésentérique selon la composition du perfusat (technique de dosage en continu)



l'absorption du glucose par cette vitamine est pratiquement immédiate et atteint aussitôt sa valeur maximale .

Les variations glycémiques observées représentent qualitativement le niveau d'absorption du glucose à chaque instant, on ne peut chiffrer l'augmentation globale de cette absorption sous l'influence de l'acide pantothénique ; la quantité totale de sang irriguant toute l'anse de Thiry-Vella pendant l'expérience étant inconnue, nous ne pouvons pas déduire la proportion de glucose passé dans le circuit sanguin .

Il est sans conteste que notre technique de micro prélèvement continu de sang à une veinule mésentérique permet à l'organisme de recevoir la plus grande partie de glucose absorbé et par conséquent de mettre en oeuvre les différents mécanismes de régulation pour le maintien de l'homéostasie . Par ailleurs, pour nous assurer des réponses physiologiques valables de l'animal en cours d'expériences, nous avons fait des expériences préliminaires de transfusion sanguine croisée entre des rats de même souche ou de souches différentes . Le mélange de sang entre deux rats s'effectue par jonction artérielle du bout céphalique de l'un avec le bout cardiaque de l'autre et vice versa pendant deux heures . Sur les sept couples de donneurs et receveurs réciproques, nous n'avons observé aucun signe clinique particulier jusqu'au delà de 15 jours après la transfusion croisée .

En résumé, les variations glycémiques au niveau d'une veinule mésentérique mettent en évidence de façon qualitative que l'activation de l'absorption du glucose par l'acide pantothénique est immédiate et d'emblée maximale .

DEUXIEME PARTIE

MECANISME D'ACTION DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE SUR L'ABSORPTION
DU GLUCOSE

Nous avons vu que l'acide pantothénique augmente l'absorption intestinale du glucose par une action "in situ" et immédiate . Cette activation est spécifique de l'acide pantothénique et requiert à la fois le groupement carboxylique et l'intégrité moléculaire de cette vitamine .

Dans cette partie nous nous sommes proposé d'élucider ce mécanisme d'action en mettant en évidence la participation active de l'acide pantothénique dans le système transporteur du glucose . Par ailleurs comme dans tout processus biologique actif la participation d'un facteur protéique est en général nécessaire . Il était donc intéressant de rechercher l'existence éventuelle d'un tel facteur , ce qui nous a incité ensuite à examiner si le dérivé biologique bien connu de l'acide pantothénique , le coenzyme A est aussi la forme active réactionnelle dans l'absorption du glucose . Pour bien cerner le problème, nous avons procédé à une analyse des teneurs en acide pantothénique et en CoA de la paroi intestinale dans différents types de perfusion .

CHAPITRE I

ACTION D'UN ANTAGONISTE DE L'ACIDE PANTOTHÉNIQUE, LA PANTOYLTAURINE, SUR L'ABSORPTION

L'acide pantothénique possède plusieurs homologues et dérivés antagonistes de son activité vitaminique mais la complexité de leur structure et l'élongation de leur chaîne carbonée posent à priori des problèmes subsidiaires quant à leur absorption intestinale. Le plus connu des antagonistes d'acide pantothénique est la pantoyltaurine dont un groupement sulfonyl remplace le groupement carboxyle de l'acide pantothénique.

L'antagonisme entre l'acide pantothénique et la pantoyltaurine a été bien étudié chez les microorganismes (SNEIL et coll. 1941). Le mode d'action de la pantoyltaurine est analogue à celui de la sulfanilamide et de l'acide pyridine-sulfonique sur les activités de l'acide para-aminobenzoïque et ^{de} l'acide nicotinique. Ils agissent à la manière d'un inhibiteur qui se combine avec une enzyme, provoquant ainsi une diminution de l'activité catalytique. Cette combinaison est stable et l'enzyme n'est plus disponible pour agir sur le substrat spécifique. Il en résulte une diminution de la concentration en enzyme libre entraînant une diminution de la vitesse de la réaction catalysée par l'enzyme.

L'intervention de la pantoyltaurine dans le métabolisme de l'acide pantothénique a été démontrée chez les bactéries par Mc ILWAIN et HUGHES 1945. En ce qui concerne les animaux supérieurs, en dehors des essais infructueux d'utilisation thérapeutique chez le rat, les investigations ont porté seulement sur la tonicité et la motilité de l'intestin en survie (COHEN et coll 1950 ; SZORADY et coll. 1962).

L'effet antagoniste de la pantoyltaurine a été recherché par ces auteurs dans la formation d'acétyl choline considérée comme responsable de la contractilité intestinale dépendante de la présence d'acide pantothénique .

La pantoyltaurine exerce ainsi un effet contraire à celui de l'acide pantothénique dans tout phénomène où il y a intervention active de ce dernier . En ce sens, la pantoyltaurine nous a paru intéressante à étudier dans l'absorption du glucose .

Conditions expérimentales .

La perfusion des anses de Thiry-Vella "temporaire" et "permanente" se fait suivant la technique habituelle . Une solution de glucose à 4 p. 100 est perfusée seule ou en présence soit de la pantoyltaurine, soit de l'acide pantothénique, soit des deux produits à la fois ; leur concentration respective est de 2,09 micromoles par ml de perfusat . La pantoyltaurine est utilisée sous forme de sel de calcium (Produit Sigma) .

Dans ces expériences, l'anse de Thiry-Vella "temporaire" permet d'étudier l'effet immédiat de la pantoyltaurine sur l'absorption intestinale par la perfusion simple alternée de deux heures en deux heures de deux solutions différentes . Dans ce dernier cas, l'introduction du deuxième perfusat commence en utilisant un débit rapide pendant un laps de temps suffisant pour éliminer le premier perfusat de l'anse intestinale .

La persistance éventuelle de l'effet de la pantoyltaurine est recherchée plusieurs jours après une première perfusion en présence de ce produit, grâce à l'anse de Thiry-Vella "permanente" avec laquelle nous pouvons répéter plusieurs perfusions sur la même anse intestinale . Les rats porteurs de l'anse "permanente" sont laissés au repos une semaine après chaque perfusion .

Tableau XII

EFFETS ANTAGONISTES DE L'ACIDE PANTOTHÉNIQUE ET DE LA PANTOYLTAURINE
SUR L'ABSORPTION INTESTINALE DU GLUCOSE

Glucose 4 pour 100 , pantoyltaurine 2,09 micromoles par ml, acide
pantothénique 2,09 micromoles par ml .

Chaque perfusion dure 4 heures . Le glucose est exprimé en mg par heure
et par 20 cm d'intestin . Le nombre d'expériences est indiqué entre
parenthèses .

Perfusion avec du glucose seul	Perfusion avec du glucose + pantoyltaurine	Perfusion avec du glucose+pantoyltaurine +acide pantothénique
101 ± 8 (6 rats)	76,37 ± 6,50 (10 rats)	117 ± 9,30 (4 rats)

Résultats et discussions

1 - L'absorption du glucose diminue nettement en présence de la pantoyltaurine comme nous le montrent les résultats rassemblés dans le tableau XII . Cette partielle inhibition atteint 20 pour 100 de la valeur observée lors de la perfusion avec du glucose seul .

2 - Mais si l'on ajoute simultanément au perfusat de l'acide pantothénique et de la pantoyltaurine, l'absorption du glucose reste à son niveau normal ; on n'observe plus l'effet produit par l'une ou l'autre de ces deux substances (Tableau XII) .

L'inhibition exercée par la pantoyltaurine est abolie par la présence en quantité équimoléculaire de l'acide pantothénique . Il est fort probable qu'en l'absence de ce dernier, la pantoyltaurine agisse sur le système transporteur du glucose en se fixant sur les mêmes sites actifs que l'acide pantothénique et l'empêche ainsi de participer au transfert du glucose .

3 - L'acide pantothénique posséderait une affinité plus grande que son antagoniste pour ces sites actifs, et formerait avec eux des liaisons très labiles favorisant la rotation du système transporteur du glucose . En faveur de cette hypothèse, la suppression de l'acide pantothénique dans le perfusat ramène l'absorption du glucose au niveau normal (Tableau XIII) ; par contre, la pantoyltaurine bloque le système transporteur d'une façon prolongée . Deux heures après la perfusion d'une solution de glucose additionné de pantoyltaurine, l'intestin ne retrouve plus le niveau d'absorption normal même en présence de l'acide pantothénique (Tableau XIV) . Le contact de la pantoyltaurine avec la muqueuse intestinale provoque en deux heures une inhibition due à la fixation que l'acide pantothénique ne parvient pas à lever au bout d'un temps d'incubation égal .

Tableau XIII

LA PRÉSENCE DE L'ACIDE PANTOTHÉNIQUE DANS LE PERFUSAT NE MODIFIE
PAS DE FAÇON PERMANENTE LA MUQUEUSE INTESTINALE .

Glucose 4 pour 100 , acide pantothénique 2,09 micromoles par ml .
Glucose exprimé en mg par heure et par 20cm d'intestin.

(Résultats obtenus sur 5 rats) .

On perfuse successivement de la même anse de Thiry-Vella "temporaire"
pendant 2 heures avec du glucose additionné d'acide pantothénique
puis pendant les deux heures suivantes avec du glucose seul .

Deux 1ères heures de perfusion avec du glucose + acide pantothénique	Deux dernières heures de perfu- sion avec du glucose seul
126,17 ± 7,14	98,75 ± 5,80

Tableau XIV

DUREE D'ACTION DE LA PANTOYLTAURINE SUR L'ABSORPTION INTESTINALE
DU GLUCOSE (RESULTATS OBTENUS SUR 4 RATS) .

Glucose 4 pour 100, pantoyltaurine 2,04 micromoles par ml, acide
pantothénique 2,09 micromoles par ml .

Glucose exprimé en mg par heure et par 20 cm d'intestin
On perfuse successivement de deux heures en deux heures la même
anse de Thiry-Vella "temporaire" avec du glucose + pantoyltaurine
puis avec du glucose + acide pantothénique .

Perfusions avec du glucose + pantoyltaurine	Perfusion avec du glucose + acide pantothénique
70,73 ± 4,5	86,59 ± 5,6

Tableau XV

MISE EN EVIDENCE PAR L'ANSE DE THIRY-VELLA PERMANENTE L'INHIBITION PARTIELLE ET PROLONGEE DE LA PANTOYLTAURINE SUR L'ABSORPTION INTESTINALE DU GLUCOSE . (RESULTATS OBTENUS SUR 5 RATS) .

Glucose 4 pour 100, pantoyltaurine 2,09 micromoles par ml, acide pantothénique 2,09 micromoles par ml .

Perfusion des mêmes anses de Thiry-Vella "permanentes" avec différentes solutions : glucose, glucose + pantoyltaurine, glucose et glucose + acide pantothénique . Chez le même rat, l'intervalle entre 2 perfusions est d'une semaine . (Glucose exprimé en mg par heure et par 20 cm d'intestin) .

1ère perfusion témoin : glucose seul	2è perfusion glucose + panto- toyltaurine	3è perfusion de contrôle : glucose seul	4è perfusion glucose + acide pantothénique
95 ± 6,5	48,6 ± 2,2	45 ± 7,1	42 ± 6,9

Chez les microorganismes, cette inhibition est, au contraire, un phénomène compétitif (MC ILWAIN et HAWKING 1943) réversible (KING et CHELDELIN 1950) .

4 - Pour confirmer le caractère définitif de l'inhibition de la pantoyltaurine sur le transport actif du glucose, nous avons pratiqué sur l'anse de Thiry-Vella "permanente" successivement des perfusions de solution de glucose seul, glucose additionné de pantoyltaurine glucose seul de nouveau puis glucose additionné d'acide pantothénique . Les perfusions d'une solution de glucose seul constituent un test de contrôle du niveau d'absorption . Les résultats consignés dans le tableau XV montrent que la pantoyltaurine exerce sur l'absorption intestinale un effet inhibiteur partiel et qui persiste plusieurs semaines après son adjonction au perfusat .

Comparée à l'effet dépressif observé dans les expériences sur des anses de Thiry-Vella "temporaires" (Tableaux XII et XIII), l'inhibition par la pantoyltaurine concernant l'anse "permanente" est beaucoup plus accusée . Ceci serait dû au contact plus long de la pantoyltaurine avec la muqueuse intestinale . En effet, nous n'avons pas procédé à un lavage de l'anse "permanente" après perfusion .

Cette inhibition, par ailleurs, n'évolue pas après l'action de la pantoyltaurine (Tableau XV) . Ce phénomène pourrait être expliqué par une altération proportionnelle à la quantité de la pantoyltaurine imprégnant la paroi intestinale ou encore à une sensibilité restreinte d'une partie du complex transporteur du glucose . La deuxième hypothèse nous semble plus probable . Elle répondrait mieux à un blocage enzymatique irréversible .

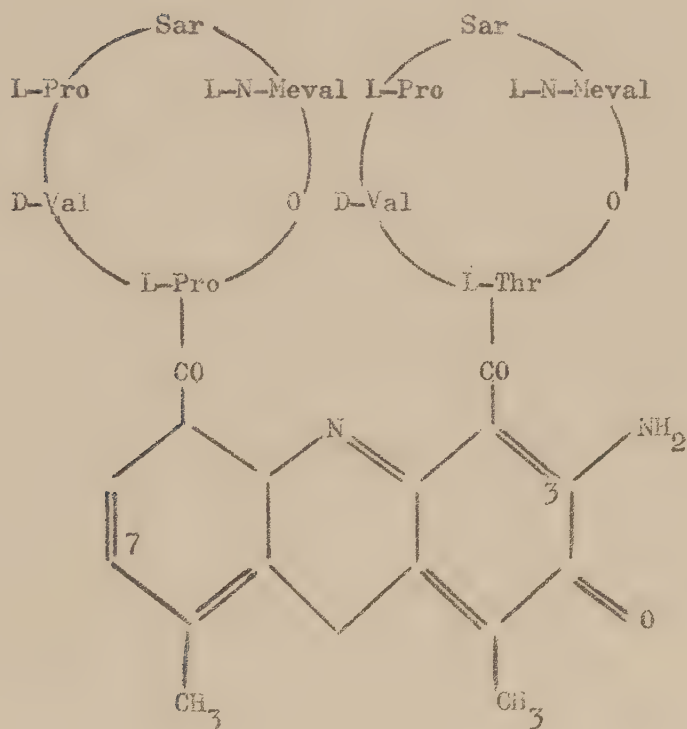
Quoiqu'il en soit, l'inhibition de l'absorption du glucose par la pantoyltaurine met en évidence des mécanismes d'ordre enzymatique dans l'action de l'acide pantothénique et souligne l'importance de la fonction carboxylique de cette vitamine .

CHAPITRE II

INTERVENTION D'UNE PROTEINE DANS L'ACTION EXERCÉE PAR L'ACIDE PANTOTHÉNIQUE SUR L'ABSORPTION DU GLUCOSE

Les inhibiteurs de la synthèse protéique les plus utilisés en expérimentation sont la puromycine C et l'actinomycine D. La puromycine inhibe la synthèse des protéines au niveau du transfert sur les ribosomes des acides aminés activés (NATHANS). L'actinomycine D bloque la biosynthèse des ARN en inhibant l'ARN polymérase et en se fixant spécifiquement sur les résidus d'acide désoxyguanylique présent dans l'ARN servant de matrice (BEICH et Coll.). Dans le processus de synthèse des protéines, elle agit sur une étape beaucoup plus avancée que la puromycine et affecte par conséquent plus facilement la formation d'une protéine - enzyme spécifique. Nous avons donc choisi l'actinomycine D pour nos expériences.

Rappelons, d'autre part, que l'actinomycine D, parmi les composés extraits de streptomyces antibiocus, possède la composition chimique la plus homogène (fig.: 12) en même temps que la toxicité la plus faible, tout en conservant ses propriétés cytostatiques. Son action s'exerce sur l'épithélium intestinal qu'elle altère sélectivement, ainsi que sur les tissus hématopoïétiques (PHILIPS et Coll. 1960). L'action de l'actinomycine D de ce fait a été étudiée dans l'absorption intestinale du calcium qui, par l'intermédiaire d'un facteur protéique, est activée par la vitamine D (NORMAN 1965, ZULL et Coll. 1965, WASSERMAN et Coll. 1966 et 1969). L'inhibition de la synthèse des protéines par l'actinomycine D abolit l'action de la vitamine D sur l'absorption du calcium. Il nous a donc paru intéressant d'examiner si cet antibiotique supprime aussi l'activation par l'acide pantothénique de l'absorption du glucose.

Figure 12Structure de l'actinomycine D ou C₁

L-Thr = L Threonine

D-Val = D Valine

L- Pro = L Proline

Sar = Sarcosine

L-N-Meval = L-N-Méthylvaline

Conditions expérimentales.

L'actinomycine D* est utilisée sous forme de solution aqueuse au 1/10 préparée extemporanément. Les rats ayant subi 15 heures de diète hydrique reçoivent l'actinomycine D par voie intrapéritonéale à raison de 0,6 mg par kilo de poids vif. 3 heures et demie après, nous réalisons chez ces rats des anastomoses^{de} Thiry-Vella " temporaires " et nous procédons à la perfusion de ces anastomoses avec une solution de glucose à 4 p. 100 additionnée ou pas d'acide pantothénique (2,09 µl par ml).

A la fin de l'expérience, le rat est sacrifié par décapitation. Le sang recolté dans un tube à hémolyse contenant 4 gouttes d'une solution à parties égales de fluorure de K à 4 p. 100 et d'oxalate de Na à 4 p. 100, ce tube étant séché au préalable à l'étuve à 100°. Le sang est bien mélangé et gardé à 4°. On provoque ensuite l'hémolyse de 0,1 ml de sang dans 1 ml d'eau bidistillée glacée. Les protéines sont précipitées par additions successives de 0,5 ml d'hydroxyde de baryum 0,33 M et de 0,5 ml de sulfate de zinc à 5 p. 100. Après centrifugation, une partie aliquote du surnageant est prélevée et on détermine la glycémie par la méthode à la glucose oxydase (voir page 14).

D'autre part, un fragment de foie de 300 à 400 mg est rapidement prélevé, lavé à l'eau bidistillée glacée, essoré au papier Joseph, puis plongé dans un tube taré contenant 3 ml de KOH à 30%. On détermine rapidement le poids exact du prélèvement. L'échantillon subit ensuite une digestion potassique au bain-marie à 100° pendant 30 minutes. On conserve le digestat à 4° jusqu'au moment du dosage de glycogène par la méthode à l'anthrone (44).

Résultats et discussions

I. Avant d'exposer les résultats obtenus, trois remarques préliminaires et importantes s'imposent.

I. Dans l'organisme, la muqueuse intestinale est un tissu hautement spécialisé qui possède probablement la plus grande vitesse de

* L'actinomycine D est fournie gracieusement par les laboratoires MERCK

renouvellement en fonction de la grande activité des entérocytes et aussi de leur histogénèse particulière, les cellules arrivées au terme de leur vie s'éliminent par desquamation. D'après BERTALANETLY (1960), la durée moyenne de vie de l'épithélium jéjunale chez le rat est de 1,3 jour. L'action d'un inhibiteur de synthèse protéique affecte naturellement de façon plus intense les systèmes d'enzymes comportant des protéines à synthèse rapide.

2. Nous avons adopté la dose d'actinomycine D (0,66 mg par kilo) utilisée par ZULL et Coll (1965) dans leurs études sur l'absorption du calcium chez le rat sous l'influence de la vitamine D. Quinze heures après l'injection intrapéritonéale de cet antibiotique, le rat fut sacrifié, puis ces auteurs ont procédé à l'examen histologique de la muqueuse intestinale qui présentait un aspect normal. Cependant, nous avons constaté, au cours de notre expérimentation, que 48 h. après administration de l'actinomycine, les animaux sont tous morts avec une forte anémie et ceci est parfaitement indépendant de la perfusion d'une anse intestinale. C'est la raison pour laquelle nous n'avons pas pu utiliser des rats porteurs de l'anse de Thiry-Vella " permanente " dans ces expériences pour étudier l'effet de l'acide parathyroïdique sur l'absorption intestinale du glucose quelques jours après l'injection d'actinomycine D. La dose d'antibiotique préconisée par ZULL et Coll. est, par ailleurs, la plus faible de celles utilisées dans ce type de recherche.

3. Selon ces mêmes auteurs (ZULL et Coll. 1966), l'actinomycine D affecte le niveau d'absorption intestinale dès la 3^e heure après son injection par voie intrapéritonéale. Ils ont étudié cependant l'action de la vitamine D sur l'absorption du calcium à la 15^e heure. Mais leur expérience consistait en une incubation d'intestin " in vitro " dans laquelle n'intervenait pas l'état général des animaux. Pour notre part, nous avons expérimenté chez

Tableau XVI

PERFUSION D'UNE SOLUTION DE GLUCOSE CHEZ LES RATS TRAITES
A L'ACTINOMYCINE D (ANSE DE THIRY-VELLA "TEMPORAIRE" L = 20cm)

	Absorption de glucose (mg par heure)	Absorption de liquide (ml par heure)	Glycémie (g par l)	Glycogène hépatique (mg par g)
	110,81	1,2	2,55	7,82
	61,05	0,5	0,83	20,20
	104,25	1,35	2,86	4,73
	99,25	2,15	2,30	6,19
	109,85	1,76	1,61	8,05
Moyenne	97,042	1,392	2,03	9,398
Déviati standard	$\pm 18,471$	$\pm 0,556$	$\pm 0,728$	$\pm 5,533$

L'actinomycine D est administrée par voie intrapéritonéale 3h30
avant l'expérience.

l'animal vivant depuis la 3e heure à la 7e heure après administration de l'actinomycine, c'est-à-dire à un moment où il n'a jamais été constaté de lésion de la muqueuse intestinale.

II. Nous avons groupé les résultats obtenus au cours des deux séries d'expériences dans les tableaux XVI et XVII.

I - L'actinomycine D abolit l'effet activateur de l'acide pantothénique sur l'absorption du glucose. Pour les deux types de perfusion, l'absorption du glucose présente un niveau d'absorption normal, sauf deux cas où ce niveau est abaissé à 61 et 67 mg par heure. Il s'agirait là de variations individuelles traduisant une sensibilité plus grande de ces deux animaux à l'actinomycine D.

2 - L'examen des résultats concernant l'absorption d'eau met en évidence une certaine indépendance d'avec l'absorption du glucose. Celle-ci ne résulte donc pas d'un effet d'entraînement passif par le flux d'eau à travers la paroi intestinale. Un tel phénomène aurait pu être la conséquence de l'altération de la muqueuse provoquée par l'actinomycine D.

3 - Seule la glycémie reflète bien le niveau d'absorption existant dans chaque cas individuel. Le stockage de glycogène hépatique est, par contre, très irrégulier malgré une surcharge glucosidique prolongée (4 h.). La fonction glycogénique du foie semble être diversement touchée par l'actinomycine D.

Ces résultats montrent que l'actinomycine D, en l'absence d'effets toxiques et de lésions de la muqueuse intestinale supprime l'activation de l'absorption du glucose par l'acide pantothénique. L'absorption d'une solution de glucose non additionné de cette vitamine reste normale. On est donc autorisé à admettre l'intervention

Tableau XVII

PERFUSION D'UNE SOLUTION DE GLUCOSE EN PRESENCE D'ACIDE PANTOTHENIQUE
(2,09 μ M/ml) CHEZ LES RATS TRAITES A L'ACTINOMYCINE D . (ANSE DE
THIRY-VELLA "TEMPORAIRE" L = 20 cm)

	Absorption de glucose (mg par heure)	Absorption de liquide (ml par heure)	Glycémie (g par litre)	Glycogène hépatique (mg par g)
	104,38	1,35	3,86	2,73
	81,75	1,63	2,14	18,90
	93,59	1,40	2,12	7,15
	113,78	1,85	1,80	23,90
	67,53	0,98	1,0	4,55
	78,30	0,46	1,34	9,40
Moyenne	89,22	1,278	2,043	11,11
Déviati on Standard	$\pm$ 16,769	$\pm$ 0,452	$\pm$ 0,909	$\pm$ 7,704

L'actinomycine D est administrée par voie intrapéritonéale 3h30
avant l'expérience.

d'un facteur protéique dans l'action de l'acide pantothénique . C'est une protéine labile dont la synthèse est rapidement atteinte par l'actinomycine D . Nous pensons devoir comparer nos résultats avec ceux observés pour l'absorption du calcium . La vitamine D favoriserait le transport du calcium à travers la paroi intestinale en induisant la formation d'un facteur protéique (NORMAN, 85 ; WASSERMAN et TAYLOR, 125 ; WASSERMAN, CORRADINO et TAYLOR, 126 ; ZULL, CZARNOWSKA-MISZAL et DE LUCA, 135) . L'acide pantothénique active l'absorption du glucose, plutôt par intermédiaire d'une protéine spécifique préexistante .

CHAPITRE III

FORME DE PARTICIPATION DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE DANS L'ABSORPTION DU GLUCOSE.

L'intervention de l'acide pantothénique dans l'absorption du glucose nécessite la présence d'un facteur protéique et la disponibilité sur cette protéine des sites actifs spécifiques du système transporteur. Il s'imposait donc d'examiner si la forme biologique sous laquelle agit l'acide pantothénique dans les réactions métaboliques, à savoir le coenzyme A, active aussi l'absorption intestinale du glucose.

L'absorption du coenzyme A (CoA) lui-même n'a pas été, à nos connaissances, étudiée. A la grande labilité du CoA en solution aqueuse s'ajoute l'action des phosphatases alcalines, ce qui rend très difficile à préciser au sein du CoA disparu, la quantité qui revient effectivement à l'absorption.

Par ailleurs, l'importance de la muqueuse intestinale et les particularités fonctionnelles de la face muqueuse des entérocytes dans le transport actif du glucose nous ont incité à étudier l'absorption du glucose en présence de coenzyme A.

I - Action du CoA à faible dose sur l'absorption du glucose.

Conditions expérimentales.

Nous avons déterminé la quantité de CoA à utiliser dans l'étude d'absorption du glucose d'après la teneur moyenne en CoA de

la paroi de l'anse intestinale . Cette teneur est de $37,4 \pm 3,437$ μg par gramme de tissu frais . Comme le poids de l'anse de Thiry-Vella (longueur = 20 cm) après perfusion varie de 1,4 à 1,6 g et le volume du perfusat constamment présent dans l'anse, de 1,5 à 2 ml, la concentration de 20 μg de CoA par ml de perfusat permet de mettre en présence du glucose et à la face muqueuse des entérocytes la quantité totale de CoA contenu dans la paroi de l'anse intestinale isolée . Dans les mêmes conditions expérimentales, nous avons perfusé l'anse "temporaire" et l'anse "permanente" . Le CoA (Produit Sigma) est ajouté extemporanément au perfusat juste avant son emploi . Le glucose est dosé par la méthode d'HOFFMAN adapté à l'autoanalyseur .

Résultats et discussions .

Les résultats des deux séries d'expériences concernant l'absorption du glucose en présence de CoA par l'anse "temporaire" ou "permanente" sont rassemblés dans le tableau XVIII.

1 - Le CoA à la concentration de 20 μg par ml ou 0,028 μM par ml ne modifie pas l'absorption du glucose qui reste identique au cas de perfusion d'une solution de glucose seul (voir tableau I, page 44) .

2 - L'anse de Thiry-Vella "permanente" dont la muqueuse est exempte de suc pancréatique qui pourrait favoriser la rupture des liaisons amide du CoA, présente le même niveau d'absorption de glucose que l'anse de Thiry-Vella "temporaire" . (Tableau XVIII).

3 - On pourrait penser d'après ces résultats que la quantité de CoA utilisé est trop faible pour agir sur l'intestin . La libération même complète de l'acide pantothénique à partir du CoA

Tableau XVIII

ABSORPTION DU GLUCOSE EN PRESENCE DE COENZYME A CHEZ LES RATS PORTEURS
D'UNE ANSE DE THIRY-VELLA "TEMPORAIRE" OU "PERMANENTE" (LONGUEUR = 20cm)

Glucose 4 pour 100, CoA 20 µg par ml, perfusion de 4 heures. La quantité
de glucose absorbé est exprimée en mg par heure de perfusion.

n° des Rats	Anse temporaire	n° des Rats	Anse permanente
101	88,3	P ₁	87,5
102	100,0	P ₂	85,5
103	72,5	P ₃	104,5
104	83,8	P ₄	89,0
105	87,0	P ₅	88,0
106	85,3	P ₆	82,5
107	91,0	P ₇	95,0
108	79,0	P ₈	93,2
Moyenne	85,86	Moyenne	90,65
Déviati on standard	± 7,613	Déviati on standard	± 6,42

présent dans le perfusat ne fournirait qu'une quantité d'acide panto-
thénique insignifiante .

Afin d'obtenir de plus amples informations sur ce problème,
nous nous sommes proposé d'étudier l'absorption du glucose en présence
d'une quantité plus grande de CoA .

II - Action du CoA à dose élevée sur l'absorption du glucose .

Dans ces expériences, nous avons supposé que la libération
de l'acide pantothénique à partir du CoA présent dans le perfusat
fournirait tout au moins dans les entérocytes, une quantité d'acide
pantothénique égale à celle contenue dans la paroi intestinale après
une perfusion en présence de cette vitamine . Ainsi nous avons fixé
une base théorique pour comparer l'action de l'acide pantothénique
à celle du coenzyme A sur l'absorption du glucose .

Nous avons d'autre part examiné les variations de la glycé-
mie et du stockage du glycogène hépatique après la perfusion pour
nous renseigner sur l'existence éventuelle d'un effet toxique du CoA
à dose élevée par conséquent sur la normalité du fonctionnement des
entérocytes .

Conditions expérimentales .

La teneur de la paroi intestinale en acide pantothénique
libre après une perfusion en présence de cette vitamine est de
 $69,98 \pm 11,429 \mu\text{g}$ par g d'intestin . En tenant compte des remarques
concernant le poids de l'anse de Thiry-Vella et le volume du perfusat
constamment présent dans l'anse, nous avons adopté une concentration
de CoA de $300 \mu\text{g}$ par ml ou $0,4 \mu\text{M}$ par ml de perfusat . Celle-ci est
calculée d'après le coefficient de conversion de RAPLAN $0,7 \mu\text{g}$ d'acide
pantothénique par unité de CoA (1 unité = $2,43 \mu\text{g}$) .

Tableau XIX *

PERFUSION D'UNE SOLUTION DE GLUCOSE EN PRESENCE D'UNE DOSE ELEVEE DE CoA CHEZ LE RAT PORTEUR D'UNE ANSE DE THIRY-VELLA "TEMPORAIRE" (L = 20 cm)

Glucose 4 p. 100, CoA 0,40 μ M par ml, perfusion de 4 heures . Le glucose est exprimé en mg par heure de perfusion, l'absorption d'eau en ml par heure de perfusion, la glycémie en g de glucose par litre et le glycogène en mg par g de foie .

	Absorption de glucose	Absorption d'eau	Glycémie	Glycogène hépatique
	73	1,27	1,75	9,05
	68	1,32	1,50	8,70
	74	1,30	1,69	10,30
Moyenne	71,66	1,29	1,64	9,35
Déviati on standard	$\pm$ 2,226	$\pm$ 0,024	$\pm$ 0,107	$\pm$ 0,686

* Etant donnée la régularité des résultats obtenus, nous n'avons pas répété nos expériences plus de trois fois.

La perfusion de l'anse de Thiry-Vella "temporaire" se fait suivant la technique habituelle . La glycémie est estimée par la méthode à la glucose oxydase et le glycogène hépatique par la méthode à l'anthrone .

Résultats et discussions .

Les différents résultats concernant l'absorption du glucose, la glycémie et le glycogène hépatique sont consignés dans le tableau XIX .

1) Contrairement à toute attente, l'absorption du glucose est nettement diminuée lorsqu'on ajoute au perfusat une forte dose de CoA . Il y a donc un effet inhibiteur qui serait dû au CoA lui même ou aux produits de dégradation du CoA avant le stade d'acide pantothénique libre . En tout cas, on serait tenté d'attribuer au groupement sulfhydryle très réactif du CoA la responsabilité de cet effet dépressif sur l'absorption intestinale du glucose

2) Quant à l'absorption d'eau, elle s'effectue à un niveau normal (Tableau XIX). La glycémie et le glycogène hépatique sont par contre peu élevés après une longue surcharge glucosidique de 4 heures (Tableau XIX). Selon nous, la quantité moindre de glucose absorbé en présence de CoA, ne suffit pas à expliquer ces phénomènes . C'est pourquoi nous étudierons comparativement dans les prochains chapitres les variations de ces phénomènes en fonction des quantités de glucose absorbées afin de dégager les relations qui peuvent exister entre les valeurs observées .

III - Action des composés à groupement sulfhydryle sur l'absorption du glucose .

On a observé une action dépressive sur l'absorption du

glucose de la pantoyletaurine qui possède un atome de soufre dans sa molécule . D'autre part, la diminution de l'absorption du glucose en présence d'une concentration élevée de CoA (0,4 μ M par ml) sans toutefois égale à celle utilisée pour la pantoyletaurine (2,09 μ M par ml) a rendu responsable la fonction thiol de cette diminution d'absorption . Il nous a donc paru intéressant d'étudier l'effet sur l'absorption du glucose des substances ayant un groupement sulfhydryle comme le glutathion et la cystéine . N'ayant pas eu d'informations sur l'effet de ces substances chez le rat, nous examinons aussi les variations de la glycémie et du stockage de glycogène hépatique dans le même but que pour le CoA .

Conditions expérimentales .

Le glutathion et la cystéine sont utilisés à la concentration de 0,4 μ M par ml de solution à 4 pour 100 de glucose . Les anses de Thiry-Vella "temporaires" sont perfusées suivant la même technique que précédemment . L'absorption est aussi considérée comme une preuve de l'état fonctionnel de la paroi intestinale . La glycémie est estimée par la méthode à la glucose oxydase et le glycogène hépatique par la réaction à l'antrone .

Résultats et discussions

Les résultats concernant les différentes analyses se rapportant au glutathion et à la cystéine sont réunis dans le tableau XX afin de pouvoir comparer facilement leur action sur l'absorption du glucose et son devenir dans l'organisme.

1) Le glutathion et la cystéine diminuent de façon identique l'absorption du glucose (80,27 et 78,7 mg par heure de perfusion) . Cependant on observe une absorption d'eau plus grande lorsqu'on perfuse une solution de glucose additionnée de glutathion .

Nous attribuons cet afflux d'eau élevé à la présence de l'acide glutamique dans la constitution du glutathion (γ glutamyl cystéyl glycine). Plusieurs auteurs ont observé dans les études sur l'absorption des acides aminés, l'augmentation d'absorption d'eau en présence de glucose en même temps que l'absorption d'un acide aminés (81).

2. La glycémie après perfusion reste voisine de celle observée après une perfusion en présence de CoA et même légèrement inférieure (1,35 g par litre dans le cas du glutathion, 1,20 g par litre dans le cas de la cystéine et 1,64 g par litre dans le cas du CoA) pour un niveau d'absorption de glucose identique (Tableaux XIX XX).

3. Le glycogène hépatique observé est nettement plus élevé dans ces expériences que celles réalisées en présence de CoA (16,3 et 17,9 au lieu de 9,35). Il y a, pensons-nous, une relation entre la baisse de glycémie et l'augmentation de glycogène hépatique.

4. Mais le fait le plus important est pour nous la diminution de l'absorption du glucose en présence de trois substances ayant dans leur constitution un groupement sulfhydryle. Nous ne nous étendrons pas sur les voies de dégradation de ces substances pour rappeler seulement qu'au cours de leurs transformations métaboliques, le groupement sulfhydryle peut être oxydé jusqu'au stade $SO_4^{=}$. Ainsi la cystéine peut donner le β sulfinyl pyruvate, un analogue de l'oxalo acétate qui est le premier substrat du cycle tricarboxylique de KREBS. A ce stade, le soufre est oxydé sous forme de $SO_2^{=}$ mais l'organisme possède des systèmes enzymatiques pouvant facilement oxyder le $SO_2^{=}$ en $SO_4^{=}$ (KEARNEY et SINGER 1953). Le radical sulfate $SO_4^{=}$ pourrait être à son tour combiné à l'ATP sous l'action des enzymes impliquées dans les réactions de formation de l'adénosine-5-phosphosulfate (APS) selon HILZ et LIPMANN (1955) :



Tableau XX

PERFUSION D'UNE SOLUTION DE GLUCOSE EN PRESENCE SOIT DE GLUTATHION, SOIT DE CYSTEINE CHEZ LE RAT PORTEUR D'UNE ANSE DE THIRY-VELLA "TEMPORAIRE" (L=20 cm) .

Glucose 4 pour 100, glutathion 0,4 μ M par ml, Cystéine 0,4 μ M par ml, perfusion de 4 heures . Le glucose est exprimé en mg par heure de perfusion, l'eau en ml par heure de perfusion, la glycémie en g par litre et le glycogène en mg par g de foie .

Absorption de glucose		Absorption d'eau		Glycémie		Glycogène hépatique	
Glut.	Cyst.	Glut.	Cyst.	Glut.	Cyst.	Glut.	Cyst.
79,8	75,4	1,72	1,22	1,42	1,26	14,9	16,80
85,0	84,0	2,05	1,65	1,41	1,27	18,0	19,0
75,9	82,0	1,8	1,50	1,30	1,25	16,50	18,95
80,4	73,7	1,5	1,40	1,29	1,20	15,90	17,93
80,27	78,7	1,76	1,44	1,35	1,24	16,33	17,93
variation $\pm$ 3,23	$\pm$ 4,415	$\pm$ 0,197	$\pm$ 0,156	$\pm$ 0,058	$\pm$ 0,026	$\pm$ 1,123	$\pm$ 1,04
standard							

Glut. : Glutathion

Cyst. : Cystéine

Il y aurait ici compétition pour l'utilisation de l'énergie fournie par l'ATP avec le système transporteur du glucose. D'autre part le β sulfinyl-pyruvate pourrait inhiber le cycle de KREBS générateur d'ATP.

En résumé, l'action dépressive des composés à groupement sulfhydryle sur l'absorption du glucose s'exercerait très probablement par une diminution d'énergie nécessaire au transport actif.

CHAPITRE IV

TENEUR DE L'INTESTIN EN CoA ET EN ACIDE PANTOTHÉNIQUE SELON LA COM- POSITION DU PERFUSAT

L'intervention spécifique de l'acide pantothénique dans le transport actif du glucose dont l'inhibition est provoquée par les composés à groupement sulfhydryle nous a conduit à étudier au niveau de la paroi intestinale, les variations de teneurs en coenzyme A et en acide pantothénique . Les modifications éventuelles observées pour des teneurs rapprochées correspondant aux différents niveaux d'absorption selon le type de perfusat utilisé nous permettent de préciser leur importance respective dans le fonctionnement du système transporteur du glucose .

Conditions expérimentales .

Les rats porteurs de l'anse de Thiry-Vella "temporaire" sont perfusés suivant la technique habituelle avec une solution de glucose seul ou en présence soit d'acide pantothénique soit de pantoéthylaurine . Les rats témoins sont perfusés avec de l'eau, l'anse intestinale subit ainsi le même effet mécanique inhérent à une perfusion .

A la fin de l'expérience, on sacrifie le rat par décapitation . On prélève rapidement toute l'anse perfusée et un fragment de foie de 400 mg environ . On les lave séparément dans de l'eau bidistillée glacée, l'intestin étant ouvert sur toute sa longueur . On les essore avec du papier Joseph et on les pèse rapidement .

Chaque échantillon est ensuite introduit dans un homocéniseur type Pötter - Elvehjem refroidi à 4°C . On les dilue en ajoutant de l'eau bidistillée glacée : 9 fois le poids d'organe prélevé pour l'intestin et 39 fois pour le foie . Puis on homogénéise à grandes vitesses . Des prises adéquates de 2 ml sont réparties dans des tubes à hémolyse refroidis à 4°C . Les concentrations finales des homogénats hépatique et intestinal sont de 1/40 et 1/10 . Sur ces homogénats, on détermine le CoA et l'acide pantothénique sous différentes formes . L'acide pantothénique libre est dosé directement dans l'homogénat préparé . L'acide pantothénique total est mesuré dans l'homogénat ayant subi une autolyse à 37°C pendant 16 heures . L'acide pantothénique lié est obtenu par différence entre l'acide pantothénique total et l'acide pantothénique libre .

Les prises servant au dosage de CoA et d'acide pantothénique libre sont tout de suite plongées dans un bain-marie à 100°C pendant 7 minutes .

Les échantillons réservés au dosage du CoA sont ensuite centrifugés à 5000 tours/minute pendant 10 minutes avec un centrifugeur refroidi à 4°C . Les surnageants sont prélevés et mis au froid pour être dosés dans l'heure qui suit par la technique de LE VAN HUNG . Les prises aliquotes pour le dosage de CoA sont respectivement 0,04 ml (foie) et 0,1 ml (intestin) .

Les échantillons destinés au dosage d'acide pantothénique libre sont traités, après chauffage au bain-marie, par l'addition de 1 ml d'hydroxyde de barium 0,33 M et de 1 ml de sulfate de zinc à 5 n. 100 . On laisse parfaire la précipitation en mettant les tubes pendant 10 minutes à 4°C . Après centrifugation, le surnageant limpide est prélevé et conservé à 0°C jusqu'au lendemain pour être dosé en même temps que les échantillons concernant l'acide pantothénique total . Dans ce dernier cas, les échantillons subissent une autolyse préalable à 37°C pendant 16 heures (technique de C. MANNAY) avant d'être chauffés au bain-marie à 100°C et traités de la même manière que les

Tableau XXI

PRISES ALIQUOTES (ml) DES DIFFERENTS ECHANTILLONS POUR LE DOSAGE
DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE LIBRE ET TOTAL SELON LES HOMOGENATS ET LA
COMPOSITION DES PERFUSATS

COMPOSITION DES PERFUSATS	INTESTIN		FOIE
	Acide panto- thénique libre	Acide pantothé- nique total	Acide panto- thénique libre
Eau (Témoin)	1	0,07	2
Glucose	1	0,07	2
Glucose + acide panto- thénique	0,02	0,02	0,5
Glucose + pantoyltan- rine	1	0,07	2

La concentration finale de l'homogénat est 1/80 pour le foie et
1/20 pour l'intestin.

échantillons destinés au dosage d'acide pantothénique libre . Leur dosage est fait par la méthode microbiologique de SMOGGS H.R. et WRIGHT L.D. . Les prises aliquotes varient suivant la forme d'acide pantothénique et le type de perfusat utilisé comme nous l'indique le tableau XXI .

Résultats et discussion

I - Teneur en CoA dans la paroi de l'anse perfusée .

Les résultats concernant la teneur en CoA de la paroi intestinale ayant subi différents types de perfusion sont rassemblés dans le tableau XXII .

1) Après une perfusion avec l'un des 3 types de perfusat (glucose seul, glucose + acide pantothénique ou glucose + pantoyltaurine) la teneur en CoA de la paroi intestinale est augmentée de façon identique par rapport à la valeur du CoA observée chez les témoins (Tableau XXII). L'absorption du glucose qu'elle soit augmentée par l'acide pantothénique ou réduite par la pantoyltaurine, ne modifie pas en conséquence la concentration de la paroi intestinale en CoA . La mobilisation de ce CoA semble ne dépendre que du glucose absorbé . Le niveau d'absorption du glucose nécessaire pour induire l'augmentation du CoA dans la paroi intestinale serait certainement inférieur au niveau d'absorption du glucose en présence de la pantoyltaurine, ce qui explique que les teneurs en CoA sont très régulières même lorsque l'absorption du glucose décroît sous l'effet de cette antivitamine .

2) Compte tenu des possibilités représentées par le potentiel enzymatique de l'intestin surtout en ce qui concerne l'apport d'énergie endogène du fait de la richesse en enzymes glycolytiques du tissu intestinal chez le rat (ANDERSON 1970), on peut penser que le CoA pourrait provenir d'une biosynthèse "in situ" très intense déclenchée

Tableau XXII

TENEUR DE L'INTESTIN EN COENZYME A EN FONCTION DU PERFUSAT INTESTINAL

	Solutions perfusées			
	Eau (Témoin)	Glucose (4 p. 100)	Glucose+acide pantothénique (2,09 μ N/ml)	Glucose+Panto- yltaurine (2,09 μ /ml)
	43,2	50	52,25	53,67
	36,1	45	51,30	42,75
	34,2	48	41,80	45,60
	36,1	54	55,10	51,30
	-	53	48,93	45,60
	-	52	48,92	53,44
	-	-	46,08	50,46
	-	-	53,96	52,25
	-	-	50,63	35,63
Moyenne	37,40	50,16	49,88	47,85
Déviatiion standard	$\pm 3,437$	$\pm 3,023$	$\pm 3,861$	$\pm 5,666$

Le Coenzyme A est exprimé en μ par gramme d'intestin frais ayant subi une perfusion de 4 heures .

Tableau XXIII

TENEURS DE L'INTESTIN EN ACIDE PANTOTHENIQUE TOTAL, LIBRE ET LIE
CHEZ LES RATS TEMOINS PERFUSES AVEC DE L'EAU .

	Acide pantothénique		
	Total (1)	Libre (2)	Lié (3)
	14,8	2,2	11,6
	13,6	2,25	11,35
	13,6	2,25	11,35
	14,00	2,3	11,70
	14,00	2,4	11,60
Moyenne	14,00	2,28	11,52
Déviati on standard	$\pm 0,438$	$\pm 0,0678$	$\pm 0,1435$

L'acide pantothénique, exprimé en $\mu\text{g/g}$ d'intestin frais, est dosé dans l'anse intestinale ayant subi une perfusion "in vivo" de 4 heures. L'acide pantothénique total est obtenu par autolyse à 37°C pendant 16 heures.

Tableau XXIV

TENEURS DE L'INTESTIN EN ACIDE PANTOTHÉNIQUE TOTAL, LIBRE ET LIÉ
CHEZ LES RATS PERFUSÉS AVEC DU GLUCOSE .

	Acide pantothénique		
	Total (1)	Libre (2)	Lié (3)
	14,4	2,45	11,55
	12,4	2,55	9,85
	12,4	1,88	10,52
	10,4	1,66	8,74
Moyenne	12,4	2,13	10,14
Déviatiôn standard	$\pm 1,4142$	$\pm 0,375$	$\pm 1,0215$

L'acide pantothénique, exprimé en $\mu\text{g/g}$ d'intestin frais, est dosé dans l'anse intestinale ayant subi une perfusion "in vivo" de 4 heures. L'acide pantothénique total est obtenu par autolyse à 37°C pendant 16 heures.

Tableau XXV

TENEURS DE L'INTESTIN EN ACIDE PANTOTHENIQUE TOTAL, LIBRE, LIÉ CHEZ
LES RATS PERFUSES AVEC DU GLUCOSE + ACIDE PANTOTHENIQUE

	Acide pantothénique		
	Total (1)	Libre (2)	Lié (3)
	86,5	77	9,5
	90	77	13
	64	50	14
	100	84,9	15,1
	85	76	9,0
	92	76,5	15,5
	67	56,5	10,5
	72,5	62	10,5
Moyenne	82,13	69,98	12,14
Déviatiion standard	$\pm 12,022$	$\pm 11,429$	$\pm 2,412$

L'acide pantothénique, exprimé en $\mu\text{g/g}$ d'intestin frais, est dosé dans l'anse intestinale ayant subi une perfusion "in vivo" de 4 heures.

L'acide pantothénique total est obtenu par autolyse pendant 16 heures.

Tableau XXVI

TENEURS DE L'INTESTIN EN ACIDE PANTOTHÉNIQUE TOTAL, LIBRE ET LIÉ CHEZ
LES RATS PERFUSES AVEC DU GLUCOSE + PANTOYLTAURINE .

	Acide pantothénique		
	Total (1)	libre (2)	lié (3)
	9,2	1,6	7,6
	11,2	1,32	9,88
	9,4	0,65	8,75
	10,6	1,0	9,6
	11,7	-	-
	9,6	-	-
	11,4	2,0	9,4
	22,8	1,32	20,48
	15,4	1,38	14,02
	15,8	2,64	13,16
	15,8	-	-
Moyenne	12,95	1,49	11,60
Déviati on standard	+3,904	+0,572	+3,900

L'acide pantothénique, exprimé en $\mu\text{g/g}$ d'intestin frais, est dosé dans l'anse intestinale ayant subi une perfusion "in vivo" de 4 heures . L'acide pantothénique total est obtenu par autolyse à 37°C pendant 16 heures .

par l'afflux de glucose absorbé . Cependant la pantoyltaurine dont l'action inhibitrice porte essentiellement sur la synthèse de CoA à partir d'acide pantothénique (de ILWAIN et HUGHES 1945) ne modifie pas par sa présence dans le perfusat, la teneur de la paroi intestinale en CoA . Cette teneur en CoA n'est pas non plus augmentée par l'acide pantothénique lorsqu'il est additionné au perfusat .

En résumé, les teneurs identiques de la paroi intestinale en CoA, observées après différents types de perfusion, traduiraient ainsi un degré de saturation des entérocytes en ce coenzyme au cours de l'absorption du glucose sans que nous puissions attribuer au CoA un rôle direct dans le transport actif de ce nutriment .

II - Teneur de la paroi intestinale en acide pantothénique

L'acide pantothénique est exprimé sous trois formes : acide pantothénique total, libre et lié . Les résultats les concernant sont consignés dans les tableaux XXIII, XXIV, XXV et XXVI. Ils sont groupés d'après la composition des perfusats qui sont, rappelons les brièvement, de l'eau pour le témoin, solution de glucose seul, solution de glucose + acide pantothénique et solution de glucose + pantoyltaurine .

1) Chez les rats témoins, l'acide pantothénique total est de 14 μ g par gramme d'intestin frais, sa forme libre 2,28 μ g par g et sa forme liée 11,52 μ g par gramme (Tableau XXIII) .

2) L'examen des résultats concernant les différentes formes d'acide pantothénique montre que dans tous les types de perfusion, la quantité d'acide pantothénique lié atteint sensiblement la même valeur variant de $10,14 \pm 1,0215$ μ g à $12,14 \pm 2,412$ μ g par gramme de tissu frais (colonne 3 des tableaux XXIV, XXV et XXVI). Ceci souligne l'importance statique de la forme liée de l'acide pantothénique au cours de l'absorption du glucose . Ces résultats s'accordent

Tableau XXVII

RAPPORTS DES FORMES LIBRE ET LIÉE DE L'ACIDE PANTOTHÉNIQUE CONTENU
DANS L'INTESTIN PERFUSÉ AVEC DIFFÉRENTES SOLUTIONS .

	Perfusat			
	Eau (Témoin)	Glucose	Glucose + AP	Glucose + Pantoyltaurine
<u>Forme libre</u>	0,198	0,21	5,75	0,127
Forme liée				
Absorption de glucose mg/h/20 cm d'intestin	-	93,5 ± 6,276 (8 rats)	122,8 ± 12,007 (8 rats)	76,7 ± 6,50 (10 rats)

Les rapports $\frac{\text{Forme libre}}{\text{Forme liée}}$ sont calculés à partir des colonnes 2 et 3 des
 Tableau XXIV à XXVI.

avec l'augmentation homogène du CoA intestinal observée dans les mêmes conditions de perfusion intestinale (Tableau XVII). Il convient d'autre part de remarquer que l'absorption moindre de glucose en présence de pantoyltaurine, coïncide avec une variation très grande des résultats concernant toutes les formes de l'acide pantothénique .

Si l'on admettait que le CoA donc la forme connue de l'acide pantothénique lié ne provient pas uniquement d'une biogenèse "in situ", comme il a été signalé, on concevrait alors que l'intestin en présence de pantoyltaurine doive intensifier le catabolisme du CoA . L'intestin disposerait dans ce cas de plus d'acide pantothénique libre pour contrer en partie l'effet de la pantoyltaurine .

3) C'est donc la forme libre de l'acide pantothénique qui est en étroite relation avec le niveau d'absorption du glucose, comme nous le montrent les rapports des formes libre et liée de l'acide pantothénique ; ces rapports sont groupés en comparaison avec les différents niveaux d'absorption de glucose dans le tableau XXVII. Nous analysons surtout les résultats concernant la perfusion d'une solution de glucose + AP (acide pantothénique) .

a - On observe en même temps que l'absorption élevée du glucose en présence d'acide pantothénique, une augmentation très accusée du rapport des formes libre et liée de cette vitamine dans la paroi intestinale . Par son mode de diffusion passive, l'acide pantothénique pourrait être présent à l'intérieur de la cellule et exercer un effet osmotique, phénomène purement physique . Dans ces conditions comme seul le côté séreux de l'intestin se prête à une simple diffusion (MINTER et coll.), le glucose pourrait passer plus rapidement vers les espaces lacunaires et entrer dans la circulation sanguine . Le compartiment intracellulaire est alors apte à recevoir d'autres molécules de glucose . Le résultat de l'ensemble de ces phénomènes est un passage plus rapide du glucose à travers la paroi intestinale .

première étape qui est l'entrée de ce nutriment dans la cellule à travers la membrane protoplasmique des villosités intestinales ; ce passage est sous le contrôle des mécanismes d'un transport actif (CRANE 1960) et règle le niveau d'absorption du glucose . Par ailleurs en dépit de la diversité des hypothèses sur le mécanisme de transport actif, le seul fait reconnu par tous les auteurs depuis CORI (1925) est l'existence d'une limite d'absorption du glucose . Il semble par conséquent peu probable que la diffusion accélérée du glucose à travers la face séreuse de l'entérocyte suffise à augmenter l'absorption intestinale du glucose .

c - Ces faits nous ont incité à penser que l'acide panto-
thénique devrait agir activement sur les mécanismes d'absorption du
glucose . L'intervention d'un facteur protéique, démontrée précédemment,
montre d'autre part que l'acide pantothénique agirait sous la forme
d'un complexe Acide pantothénique - Protéine très labile pour accélérer
la rotation du système transporteur du glucose . La formation de ce
complexe activateur dépendrait du rapport des formes libre et liée
de l'acide pantothénique . Ce complexe serait très instable et se
détruirait sous l'effet du chauffage utilisé pour le dosage microbio-
logique de l'acide pantothénique . L'acide pantothénique lié sous une
forme différente du CoA, a été signalé par NISHI, KING et CHELDWIN (83)
comme une forme conjuguée non dialysable et indifférente à la réaction
d'acétylation de la sulfanilamide .

TROISIEME PARTIE

ACTION DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE ET DU COENZYME A SUR LE DEVENIR DU
GLUCOSE APRES SON ABSORPTION .

Le schéma précis et évocateur de la barrière intestinale d'après KINTER souligne l'importance du contexte fonctionnel des entérocytes . Ils possèdent certes un mécanisme autonome de perméabilité sélective . Néanmoins, l'existence du phénomène de diffusion passive au travers de la membrane séreuse par laquelle les cellules sont en contact étroit avec le sang, place indirectement les entérocytes sous la dépendance des mécanismes de régulation de la glycémie .

En général, on considère que le niveau de la glycémie dépend de l'absorption du glucose, mais certains auteurs (CASEY et coll. en 1968) admettent qu'il y a une répercussion de la glycémie elle même sur la vitesse de cette absorption . La régulation de la glycémie est la résultante de la mise en oeuvre d'un ensemble complexe de mécanismes hormonaux et métaboliques où priment les phénomènes de glycogénèse et de glycogénolyse . La mise en jeu rapide de ces mécanismes et leur importance respective à l'encontre d'apports massifs de glucose régissent l'utilisation de ce nutriment .

Il nous a donc paru intéressant d'étudier à la fois au niveau de la glycémie et de la glycogénèse hépatique, les effets éventuels de l'absorption du glucose lorsque cette absorption est soumise à l'influence de certaines substances notamment acide panthothénique , coenzyme A et pantoyltaurine .

CHAPITRE I

GLYCÉMIE ET ACI E PANTOTHÉNIQUE

Conditions expérimentales .

Les rats utilisés sont porteurs d'une anse de Thiry-Vella "temporaire" . Après avoir subi une perfusion de 4 heures, ils sont sacrifiés par décapitation . Le sang est récolté dans des tubes à hémolyse contenant un mélange de fluorure de potassium et d'oxalate de sodium . Une partie aliquote est prélevée et traitée comme précédemment en vue de déterminer la glycémie par la méthode à la glucose oxydase (voir page 14) .

D'autre part, dans une deuxième série d'expériences, sur un rat préalablement hépariné, nous suivons en flux continu, pendant la perfusion intestinale, les variations glycémiques par l'autoanalyseur au niveau de la veine jugulaire . L'animal subit en même temps une transfusion compensatrice . Les détails techniques ont été exposés antérieurement (voir page 72) .

Résultats et discussions .

Les résultats concernant la glycémie après perfusion sont rassemblés dans le tableau XXVIII.

1 - Si l'on se réfère à la glycémie d'un rat à jeun (0,87 g par litre), la perfusion avec une solution de glucose pendant 4 heures double la glycémie (1,8 g par litre) .

Tableau XXVIII

VARIATION DE LA GLYCEMIE EN FONCTION DE LA COMPOSITION DU PERFUSAT .

Glucose 4 p. 100, acide pantothénique 2,09 μ M par ml, pantoyletaurine 2,09 μ M par ml, coenzyme A 0,028 μ M par ml . Les nombres entre parenthèses rappellent la valeur de l'absorption du glucose (mg par heure par 20 cm d'intestin) correspondant à chaque perfusat .

	Solutions perfusées			
	Glucose (93,5 $\pm$ 6,276)	Glucose+acide pantothénique (122,8 $\pm$ 12,09)	Glucose + pan- toyletaurine (76,37 $\pm$ 6,50)	Glucose + co- enzyme A (85,86 $\pm$ 7,615)
	1,70	3,07	2,60	1,40
	1,68	2,50	1,45	1,25
	2,30	2,35	1,70	1,37
	2,45	2,84	2,25	1,31
	1,95	3,18	2,50	1,35
	1,74	2,80	1,95	1,48
	2,00	2,75	1,80	1,55
Moyenne Déviation standard	1,99 $\pm$ 0,281	2,78 $\pm$ 0,271	2,04 $\pm$ 0,396	1,39 $\pm$ 0,0943

L'acide pantothénique qui ajouté au perfusat augmente l'absorption du glucose, accroît encore l'hyperglycémie jusqu'à la valeur de 2,78 g par litre (+227 pour 100) .

A faible dose le CoA est, nous l'avons vu, sans effet sur l'absorption du glucose mais il diminue singulièrement la courbe hyperglycémique (59 pour 100), ce qui pourrait être la preuve d'une utilisation du glucose plus intense .

Quant à la pantoyltaurine qui inhibe partiellement l'absorption du glucose, elle est au contraire sans effet sur l'augmentation de la glycémie .

2 - Ces résultats mettent en évidence les effets contraires de l'acide pantothénique et du CoA sur les phénomènes d'absorption du glucose . La forte hyperglycémie provoquée par la perfusion d'une solution de glucose + acide pantothénique montre que cette vitamine active non seulement l'absorption intestinale du glucose mais maintient par un effet particulier la glycémie à un niveau élevé . L'afflux de glucose absorbé dans le sang y jouerait un rôle indéniable. Mais les travaux de LESTRIN - LERNER et coll. (46) sur le rat et d'AGNOULD et coll. (6) sur le chien ont montré que le glucose absorbé lors d'une surcharge intestinale modifie peu la glycémie . Peut-être faudrait-il remarquer que l'hyperglycémie post-digestive est progressive, très étalée dans le temps . Nos expériences de perfusion sont suffisamment longues pour que nous puissions observer dans tous les cas une forte hyperglycémie au bout de 4 heures de perfusion .

L'hyperglycémie très prononcée au cours d'absorption de glucose en présence d'acide pantothénique semble dépendre aussi d'une action propre de cet acide . FIDANZA et coll. ('38) ont administré au cobaye par voie parentérale 2 doses différentes d'acide

pantothénique 10 mg par 100 g et 100 mg par 100 g de poids vif . Il ont constaté que les animaux ayant reçu la forte dose présentaient une glycémie plus élevée que les témoins non traités . Ces auteurs n'ont pas donné d'explications de ce phénomène . L'acide pantothénique provoque -t-il une glycoséolyse plus intense ou une utilisation tissulaire moindre de glucose .

Quoiqu'il en soit, l'hyperglycémie très accusée dans le cas de perfusion d'une solution de glucose additionné d'acide pantothénique résulte, croyons nous, de phénomènes beaucoup plus complexes qu'une simple surcharge intestinale .

3 - Le problème est d'autant plus intéressant que le dérivé biologique de l'acide pantothénique, le CoA, ajouté au perfusat à faible dose ne modifie pas l'absorption du glucose mais il abaisse l'hyperglycémie pour une même quantité de glucose absorbé (1,99 g par litre à 1,59 g par litre) .

Plusieurs auteurs ont abordé le phénomène de stabilisation par un constituant du coenzyme A de la courbe d'hyperglycémie provoquée . On n'a pas pu obtenir des résultats concluants avec le panthénol mais l'injection de la D,L cystéamine semblait stabiliser l'hyperglycémie provoquée (DE BOUCAUD et coll.) . Par ailleurs nos résultats concernant la glycémie après perfusion d'une solution de glucose additionné de pantoyltaurine montrent que cet homologue de l'acide pantothénique possédant une action antagoniste de cette vitamine n'influe pas sur la courbe hyperglycémique (Tableau XXVIII) .

L'effet stabilisateur du CoA sur l'hyperglycémie provoquée ne dépendrait pas du constituant acide pantothénique mais il relèverait plutôt du groupement sulphydryle . Ainsi dans les expériences de DE BOUCAUD, la D-L cystéamine s'oppose à l'hyperglycémie . De même, nous avons observé que la cystéine et le glutathion ajoutés au perfusat ne provoquent qu'une hyperglycémie très légère (1,55 g

Figure 13 : Glycémie au niveau de la veine jugulaire selon la composition du perfusat (Technique de dosage en continu).

Graphique 3 (Glucose + CoA)

Graphique 2 (Glucose + Acide panthothénique)

Graphique 1 (Glucose)

par litre et 1,24 g par litre). Nous pensons donc que le groupement sulfhydryle agirait directement sur la glycémie en intervenant dans les mécanismes de régulation du glucose.

4) - L'hyperglycémie modérée en présence de CoA et des substances à groupement sulfhydryle nous semble être sous la dépendance étroite de ces composés. Il y a au niveau de la veine jugulaire une augmentation progressive de la glycémie puis après un certain temps elle se stabilise à un niveau constant. Le graphique de la figure 13 enregistré en flux continu par l'autoanalyseur nous en fournit une preuve évidente. Nous nous contentons de l'aspect qualitatif de la courbe hyperglycémique, car l'estimation de la glycémie par la méthode d'Hoffman (ferricyanure de potassium) adaptée à l'autoanalyseur présente des différences avec la glycémie déterminée par la glucose oxydase. Toutefois, le niveau constant de la glycémie jugulaire à la fin de l'expérience de perfusion plaide en faveur d'une stabilisation glycémique par les substances à fonction sulfhydryle. Nous envisageons dans un proche avenir d'adapter à l'autoanalyseur la méthode à la glucose oxydase pour doser en flux continu le glucose sanguin chez le rat.

CHAPITRE II

LE GLYCOGÈNE HÉPATIQUE APRÈS ABSORPTION INTESTINALE DU GLUCOSE EN PRÉSENCE D'ACIDE PANTOTHÉNIQUE .

L'hyperglycémie provoquée par une surcharge intestinale en glucose varie non seulement en fonction de la quantité de glucose absorbé mais aussi du fait de la présence des substances ajoutées au perfusat . Elles peuvent agir sur les mécanismes complexes de régulation de la glycémie et modifier en particulier la mise en réserve du glucose au niveau du foie . En nous limitant au seul aspect quantitatif de la glycogénèse hépatique, nous nous sommes proposé d'analyser les teneurs du foie en glycogène, en acide pantothénique et en coenzyme A afin de dégager une relation éventuelle entre ces valeurs ; ce qui pourrait expliquer les variations de l'hyperglycémie constatées .

Conditions expérimentales.

Après perfusion, le rat est sacrifié par décapitation, des fragments de foie de 300 à 400 mg sont rapidement prélevés et traités de façon adéquate en vue de déterminer les teneurs en glycogène, en acide pantothénique libre et en coenzyme A . Le glycogène est dosé par la méthode à l'anthrone, l'acide pantothénique libre par la méthode microbiologique de SPREGG et WRIGHT, le CoA par la méthode de LE VAN HUNG . Les différents détails techniques ont été exposés antérieurement (voir pages 17 et 104) .

Résultats et discussions

I - Les résultats concernant les teneurs du foie en glycogène

sont rassemblés dans le tableau XIX .

1) Après perfusion avec la solution de glucose, le glycogène hépatique est de 38,66 mg par gramme de foie . L'adjonction de CoA au perfusat ne modifie pas la valeur du glycogène stocké (37,75 mg par gramme) . En revanche, l'acide pantothénique dans les mêmes conditions de perfusion accroît fortement cette teneur en glycogène (55,01 mg par gramme) . Quant à la pantoyltaurine, elle exerce ici encore un effet inhibiteur ; la quantité de glycogène diminue nettement (21,92 mg par gramme) .

2) Donc lorsqu'on perfuse avec du glucose additionné soit de CoA soit de pantoyltaurine, on voit qu'il n'y a pas de relation entre la valeur de la glycémie et l'ampleur du stockage de glycogène . Prenant en considération les tableaux XVIII et IX , on constate que :

a - Le CoA dont la présence dans le perfusat conduit à une glycémie inférieure à celle obtenue par le glucose seul (Tableau XVIII), provoque la même synthèse de glycogène (37,75 et 38,66 mg par gramme) et ceci pour une absorption intestinale de glucose identique dans les deux cas . La glycémie inférieure en présence du CoA suppose que le glucose absorbé est utilisé à d'autres fins : synthèse de lipides et d'aminoacides, ce qui expliquerait, en partie, la stabilisation de la courbe d'hyperglycémie en présence du CoA .

b - La pantoyltaurine qui diminuait l'absorption du glucose tout en provoquant cependant une glycémie analogue à celle due à la perfusion de ce nutriment seul, conduit à des teneurs en glycogène nettement plus faibles . Cette diminution de stockage du glycogène résulterait simplement d'une absorption moindre de glucose .

3) L'acide pantothénique ajouté au perfusat augmente simultanément les trois valeurs en question (absorption, glycémie, glycogène hépatique) . Le stockage élevé de glycogène pourrait

Tableau XXIX

TENEUR DU FOIE EN GLYCOGENE SELON LES SOLUTIONS PERFUSEES

	Solutions perfusées			
	Glucose (4 p. 100)	Glucose+CoA (0,028 μ M/ml)	Glucose+aci- de pantothéni- que(2,09 μ M/ml)	Glucose + Pan- toyltaurine (2,09 μ M/ml)
	37,00	36,30	62,80	25,30
	36,10	40,60	49,90	16,15
	43,80	37,00	52,40	32,20
	40,18	38,10	59,18	13,60
	38,60	36,50	48,30	18,90
	39,20	39,52	54,20	35,20
	40,30	40,90	52,90	15,80
	34,10	33,0	60,40	18,19
Moyenne	38,66	37,55	55,01	21,92
Déviati on standard	$\pm 2,779$	$\pm 2,458$	$\pm 4,876$	$\pm 7,554$

Le glycogène est exprimé en mg par gramme de foie d'un rat ayant subi 4 heures de perfusion intestinale .

avoir une double origine .

a - On sait que l'afflux du glucose dans l'organisme stimule la sécrétion d'insuline laquelle non seulement inhibe la conversion de phosphorylase b en phosphorylase a, enzyme active, qui catalyse la dégradation du glycogène mais accroît l'activité de la glycogène-synthétase . L'augmentation du glycogène hépatique a été observée par GODEKEN et coll. (42) chez le rat ayant ingurgité 2 ml de solution de glucose à 50 p. 100 . Des mesures de la synthèse du glycogène à partir d'UDP-Glucose marqué dans les foies de ces animaux montrent que l'activité totale de la glycogène-synthétase est multipliée par 5 ou 6 . Ce fait semble en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'acide pantothénique agirait sur la synthèse du glycogène par l'intermédiaire de l'insuline dont la sécrétion est directement stimulée par une surcharge plus prononcée de glucose en présence de cette vitamine .

b - D'autre part, en incubant en présence de phosphorylase l'homogénat du muscle de bréchet de pigeon, ROBBINS et LIPMAN observaient en 1959 que le CoA augmentait "in vitro" l'incorporation de glucose dans le glycogène . Mais selon ces auteurs, l'action du CoA serait ici de maintenir simplement le niveau de la respiration cellulaire, source de l'énergie endogène nécessaire au processus de synthèse . Cependant l'addition au milieu d'incubation de composés énergétiques tels que l'ATP et la créatine phosphate ne permettait pas d'observer le même phénomène d'incorporation active de glucose dans le glycogène .

Il y a certainement intervention directe de l'acide pantothénique ou du CoA dans la synthèse du glycogène du foie . Devant les faits contradictoires, il nous a semblé intéressant d'examiner les variations quantitatives au niveau du foie de l'acide pantothénique et du CoA en fonction des différents types de perfusion . La participation de ces substances dans la glycogénèse

Tableau XXX

TENEURS DU FOIE EN ACIDE PANTOTHENIQUE LIBRE SELON LA COMPOSITION DU PERFUSAT
INTESTINAL

	Solutions perfusées			
	Témoïn (eau)	Glucose (4 p. 100)	Glucose+acide pantothénique (2,09 μ M/ml)	Glucose + pan- toyltaurine (2,09 μ M/ml)
	4,0	2,92	4,72	2,96
	3,6	3,2	3,84	1,68
	3,12	2,84	10,1	2,0
	2,96	3,36	6,32	2,48
	2,88	—	7,40	1,64
	—	—	5,44	1,24
	—	—	4,48	1,20
	—	—	7,36	1,57
	—	—	4,0	1,64
	—	—	4,8	—
Moyenne	3,31	3,08	5,85	1,82
Déviati on standard	$\pm 0,425$	$\pm 0,209$	$\pm 1,868$	$\pm 0,541$

L'acide pantothénique libre est exprimé en μ g par gramme de foie d'un rat ayant subi 4 heures de perfusion .

hépatique supposerait à priori une diminution de leur concentration .

II - Nous avons donc groupé en fonction de la composition des perfusats les différentes valeurs trouvées pour l'acide panto-
thénique sous forme libre dans le foie - tableau XXX - et les te-
neurs du foie en coenzyme A, tableau XXXI. Le CoA est considéré
jusqu'à maintenant comme la seule forme active de l'acide pantothé-
nique lié .

1) On constate que par rapport aux teneurs en acide pan-
tothénique des foies de rats témoins, la perfusion intestinale de
glucose ne modifie pas la quantité d'acide pantothénique libre
(3,31 et 3,08 μ g par gramme de foie) . Mais l'acide pantothénique
ajouté au perfusat double cette teneur hépatique (5,85 μ g par g.)
alors que la pantoyltaurine réduit cette teneur de 50% environ
(1,82 μ g par g.); dans l'ensemble les teneurs vont donc de 1,82 à
5,85 μ g par gramme . On voit que la quantité d'acide pantothénique
libre du foie varie peu en dépit de l'apport d'acide pantothénique
libre ou de son antagoniste, la pantoyltaurine, ce qui montre que
le rôle joué ^{par} l'acide pantothénique libre au niveau du foie a moins
d'importance qu'au niveau de l'intestin .

2) Les résultats concernant la teneur du foie en CoA pré-
sentent quelques particularités (Tableau XXXI) .

La pantoyltaurine diminue l'absorption du glucose, mais
la quantité de CoA présente dans le foie est comparable à celle
observée dans le cas d'une perfusion de glucose seul . Elle est
environ de 29 pour 100 plus élevée que chez les témoins . Par contre,
la perfusion en présence d'acide pantothénique malgré une absorp-
tion maximale de glucose n'accroît la teneur du foie en CoA que de
9 pour 100 par rapport au témoin (Tableau XXXI).

Tableau XXXI

TENEURS DU FOIE EN COENZYME A SUIVANT LA COMPOSITION DU PERFUSAT.

	Solutions perfusées			
	Eau (Témoin)	Glucose (4 p. 100)	Glucose + acide pantothénique (2,09 μ /ml)	Glucose + Pan- toyltaurine (2,09 μ /ml)
	294,50	403,80	356,25	356,25
	313,50	361,00	327,25	384,75
	315,50	399,00	332,50	394,25
	304,00	408,50	342,00	384,75
	-	390,00	356,25	394,25
	-	378,10	323,00	451,25
	-	-	299,25	361,00
	-	-	318,25	418,00
	-	-	351,50	426,55
Noyenne	306,57	389,98	334,08	396,78
Déviati on standard	$\pm 7,876$	$\pm 16,313$	$\pm 18,198$	$\pm 28,927$

Le Coenzyme A est exprimé en μ par gramme de foie d'un rat ayant subi une perfusion intestinale de 4 heures .

3) On constate, d'après ces résultats, que l'afflux du glucose provoque une augmentation de concentration en CoA au niveau du foie, de même qu'au niveau de la paroi intestinale, comme on l'a dit précédemment.

En se reportant aux quantités de glycogène qui correspondent aux diverses perfusions (Tableau XXIX), nous nous apercevons que le CoA du foie augmente peu lorsque le glycogène hépatique accuse le maximum de dépôt. A première vue, cette évolution inverse des deux teneurs n'est pas en accord avec l'hypothèse d'une intervention de l'acide pantothénique dans la synthèse du glycogène. Mais si l'on tient compte de l'augmentation des lipides au niveau du foie sous la seule action de l'acide pantothénique (38) il est à penser que le CoA pourrait être mobilisé dans d'autres lieux de synthèse importante de lipides tels que les tissus adipeux. En effet, la formation de l'acetyl-CoA et surtout de l'acétyl-CoA est une étape nécessaire de la synthèse des lipides. L'acide pantothénique pourrait avoir un double rôle dans la mise en réserve du glucose par son intervention dans deux processus de synthèse, celle du glycogène et celle des lipides. La concentration moindre en CoA du foie lorsque l'on perfuse l'intestin avec une solution de glucose en présence d'acide pantothénique souligne encore l'importance nutritionnelle de cet acide pantothénique.

Afin de vérifier la valeur de l'hypothèse concernant le rôle de l'acide pantothénique dans la synthèse du glycogène hépatique, nous avons entrepris d'étudier l'influence de l'AP et du CoA sur l'activité " in vitro " de la glycogène synthétase.

CHAPITRE III

EFFET "IN VITRO" DE L'ACIDE PANTOTHÉNIQUE ET DU COENZYME A SUR L'ACTIVITE DE LA GLYCOGENE SYNTHETASE .

On sait aujourd'hui que le glycogène est synthétisé dans l'organisme uniquement par la voie faisant intervenir l'UDPG glycogène transglucosylase :



De nombreux faits expérimentaux montrent que la phosphorylase n'intervient que pour dégrader le glycogène . Nombreuses sont les preuves formelles apportées par les travaux de SUTHERLAND et coll. (109), CAHILL et coll. (14) et ROBBINS et coll. (94) sur l'action glycogénolytique à la fois "in vivo" et "in vitro" des phosphorylases . Enfin dans certaines dystrophies musculaires accompagnées de la disparition des phosphorylases du muscle, les réserves de glycogène ne sont pratiquement pas modifiées (99) .

L'étude de la synthèse du glycogène a fait un grand progrès lorsque LELOIR et CARDINI (68) ont mis en évidence, pour la première fois en 1957, la présence de glycogène synthétase dans le foie de rat . Ces faits ont été confirmés depuis LELOIR et coll. (69), VILLARPALASI et LARNER (124) et la présence de l'enzyme a été relevée dans divers tissus : muscle, diaphragme, coeur, reins, cerveau .

Ces auteurs ont montré que la présence de glycogène ou de molécules de glucose hautement polymérisées était nécessaire

pour amorcer la réaction de transfert du glucose à partir de l'UDPG pour former la liaison glucosidique $\alpha(1 \rightarrow 4)$.

Une deuxième enzyme, l'enzyme de branchement est nécessaire pour compléter la structure ramifiée de la molécule de glycogène par des liaisons $\alpha(1 \rightarrow 6)$ entre des chaînes de glucosyl $\alpha(1 \rightarrow 4)$. L'enzyme responsable de l'utilisation directe du glucose dans la synthèse de glycogène est la glycogène synthétase .

Elle présente des propriétés intéressantes . Dès 1959, LELOIR et coll. (69) constataient que le glucose-6-phosphate activait nettement la glycogène-synthétase . Cette activation avait lieu pour une concentration de glucose-6-phosphate de $6.10^{-4}M$ (65), (69), ce qui correspond à la concentration de glucose-6-phosphate dans les tissus . On voit quel est le rôle du glucose-6-phosphate dans la régulation de l'activité de la glycogène-synthétase . D'autres hexoses phosphates peuvent remplacer le glucose-6-phosphate, mais ce dernier est le plus actif (ROSSEL-PEREZ et LARNER (97)) .

D'autre part, VILLAR-PAIASI et LARNER (123), ayant observé dans le muscle traité à l'insuline, une activité élevée de la glycogène-synthétase en l'absence de glucose-6-phosphate, émettent l'hypothèse de l'existence, dans le muscle, de deux formes interconvertibles de glycogène synthétase :

- une forme D dépendante du glucose-6-phosphate .
- Une forme I indépendante du glucose-6-phosphate .

leur interconversion étant influencée par l'insuline . Il faut noter que le terme "indépendant" n'est pas entièrement exact puisque le glucose-6-phosphate abaisse le K_m de cette forme I pour l'UDP-glucose, par conséquent, il stimule la réaction pour des concentrations basses de substrat (respectivement $K_m 8.10^{-3}$ et $K_m 7.10^{-5}$) .

Depuis les études sur l'activité de la glycogène-synthétase

sont orientées vers les facteurs susceptibles d'agir sur les formes actives de cette enzyme . ROSSEL-PRECEZ et LARNER (96), APPLEMAN, BELOCOPITOW et TORRES (5) ont montré ainsi que la forme I était phosphorylée par l'ATP, et transformée en forme D par une réaction que stimule le 3',5'-adénosine monophosphate cyclique . la réaction est catalysée par une transférase kinase, probablement différente de la phosphorylase b kinase, phosphorylant les résidus sérines de la synthétase (LARNER , 66) . La réaction inverse, (conversion de D en I), est catalysée par une phosphatase . Des interconversions similaires de deux formes de la glycogène synthétase du foie ont été signalées par HIZUKURI et LARNER en 1963 (47) par LARNER en 1964 (66) .

La conversion de I en D se fait également par incubation avec $\frac{W}{Ca^{++}}$ et une protéine ou par traitement à la trypsine (APPLEMAN et coll., 5) . Le changement d'activité de la glycogène synthétase induit par le Ca^{++} n'est pas observée avec le Zn^{++} , le Mg^{++} , le Mn^{++} . D'autre part, le Ca^{++} n'agit qu'en présence d'un facteur protéique isolé par centrifugation à 100.000 $\times$ pendant deux heures après précipitation acide (pH 5,1) d'un broyat de muscle de rat . Ce facteur se trouve dans le surnageant ; il est thermolabile, non dialysable et digéré par la trypsine (5) . BELOCOPITOW (10) a observé que la glycogène synthétase est inhibée par l'adrénaline, selon un mécanisme impliquant un acide adénylique cyclique 3'-5', qui stimule par ailleurs l'interconversion de la phosphorylase b en phosphorylase a active . Mais des expériences d'inhibition de la glycogène synthétase par la puromycine ont mis en doute le rôle de l'AMP cyclique dans l'activation de cette enzyme (SOVICK) .

Enfin, les groupes SH de la cystéine, du glutathion, du 2-mercaptoéthanol sont nécessaires pour la réactivation de la glycogène synthétase purifiée, conservée dans le sulfate d'ammonium .

L'inhibition de l'enzyme par le parahydroxymercurobenzoate confirme la nécessité des groupes SH pour l'activité enzymatique (MORNFELD et BROWN, 65) .

La présence des résidus sérines pour la transformation de la forme I en D, et celle des groupes SH pour la régénération de l'activité de l'enzyme purifiée, sont à rapprocher des fonctions alcool et sulfhydryle du CoA dont le constituant A P ajouté à une solution isotonique de glucose, provoque après perfusion intestinale, les augmentations maximales de la glycémie, de l'absorption intestinale du glucose et du dépôt de glycogène dans le foie .

Nous pensons que l'acide pantothénique et le coenzyme A agissent en augmentant l'activité de la glycogène-synthétase. C'est pourquoi, nous avons entrepris l'étude "in vitro" de leurs effets sur l'activité de cette enzyme.

Conditions expérimentales

Nous avons employé la technique de préparation de l'extrait brut de la glycogène synthétase du foie et mesuré son activité par estimation indirecte du pyruvate selon la méthode de BELOIR et GOLDBERG (70) . La composition du milieu d'incubation est modifiée par l'utilisation du milieu protecteur de CoA . Les résultats obtenus concernant cette adaptation qui conserve pleinement les qualités du dosage ont été exposés dans la partie technique (voir page 24) .

Résultats et discussions

1- Détermination des doses de CoA et d'acide pantothénique utilisées .

L'essai de différentes doses d'acide pantothénique et de

Tableau XXXII

INFLUENCE DE DIFFÉRENTES DOSES DE CoA ET D'ACIDE PANTOTHÉNIQUE
SUR L'ACTION DE LA GLYCOGÈNE-SYNTHÉTASE (EN μM D'UDP PAR MINUTE
ET PAR GRAMME DE FOIE)

Doses de CoA	Activité enzymatique	Doses d'acide pantothénique	Activité enzymatique
μM	μM	μg	μM
0	2,10	0	2,10
0,5	2,28	5	1,92
1,0	3,15	10	2,10
2,0	2,16	20	1,56
4,0	2,28	-	-

CoA sur l'activité de la glycogène-synthétase, montre des activités maximales pour 10 μ g et un 1 μ g respectivement . Mais tandis que le CoA renforce l'activité enzymatique, l'acide pantothénique la réduit toujours sauf à la concentration de 10 μ g, qui est sans effet (Tableau XXXII).

Nous avons donc adopté ces doses pour nos recherches . Toutefois, nous dissolvons le CoA et l'acide pantothénique dans le milieu protecteur, non dans l'eau ou dans le tampon, car ces solutions donnent des activités enzymatiques irrégulières, voire nettement diminuées . La solution de protection semble jouer une action protectrice du CoA, ainsi que LE VAN HUNG (71) l'avait déjà observé dans sa méthode de dosage du CoA .

2 - Effets activateurs du CoA et de l'acide pantothénique sur la glycogène-synthétase en fonction du temps de conservation de l'homogénat .

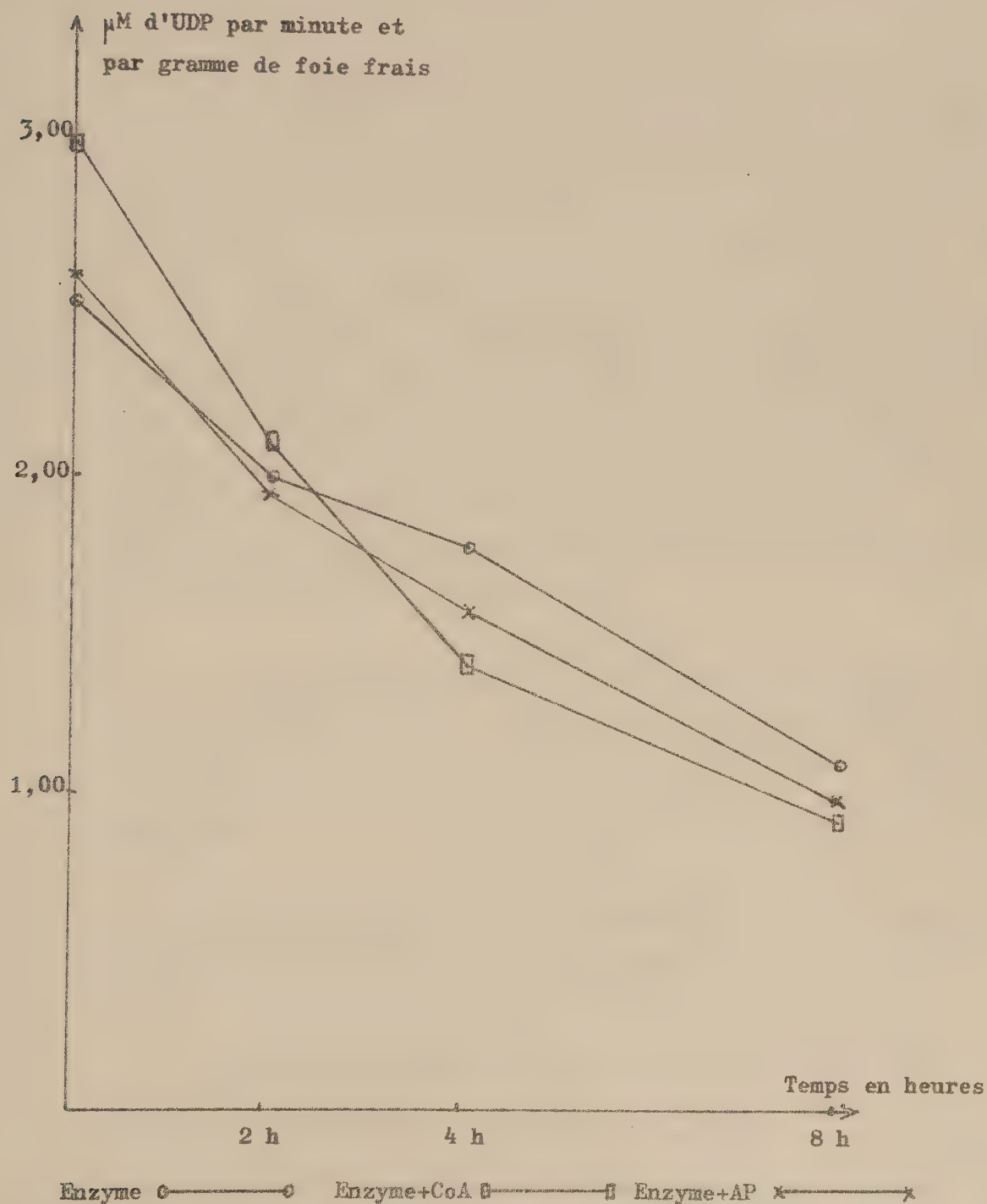
L'homogénat brut est réparti dans plusieurs tubes maintenus à 4°C . Les mesures d'activité enzymatique en fonction du temps de conservation de l'homogénat, montrent une chute régulière de l'activité au cours de la conservation : l'activité est réduite de 22 p. 100 environ après deux heures et de 56 p. 100 après huit heures (fig.14)

L'adjonction de CoA ne provoque une activation régulière (+17 p. 100) de l'activité de la glycogène-synthétase que sur l'homogénat frais . Le CoA devient inhibiteur lorsque l'homogénat a plus de deux heures .

L'adjonction d'acide pantothénique est sans effet sur l'homogénat frais, tandis qu'il diminue l'activité de la glycogène-synthétase de l'homogénat datant de plus de deux heures .

Notons, d'autre part, que la perte de l'activité enzymatique

Figure: 14 - Effets du CoA et de l'acide pantothénique sur la glycogène-synthétase en fonction du temps de conservation de l'homogénat



En ordonnée sont portées les activités enzymatiques exprimées en micromoles par minute et par gramme de foie frais, et en abscisse le temps de conservation de l'homogénat à la température de 4° C. AP-acide pantothénique

potentielle de l'homogénat est très grande dans les heures suivant la préparation. Il est fort probable que le temps de préparation de l'homogénat y joue un grand rôle.

3 - Effets du CoA et de l'acide pantothénique sur l'activité de la glycogène-synthétase de l'homogénat frais

Les résultats rapportés dans le tableau XXXIII montrent que :

a. Les conditions de réaction étant optimales (stabilisation de l'enzyme par excès de glucose-6-phosphate, temps d'incubation 10 minutes, température 38°C, pH 7,5), l'activité de la glycogène-synthétase varie d'un homogénat à l'autre (1,92 à 2,85 micromoles d'UDP par minute et par gramme de foie). La valeur maximale observée est égale à celle de LELOIR et GOLDEMBERG (0,95 micromole d'UDP par minute et par millilitre d'homogénat de foie de rat, ce qui correspond à 2,85 micromoles d'UDP par minute et par gramme de foie).

b. L'addition du milieu protecteur + CoA au milieu d'incubation de l'homogénat de foie frais amène une activation nette et immédiate (42 p. 100 en moyenne) de la glycogène-synthétase. Cette activation est plus marquée dans le cas d'un homogénat de faible activité enzymatique.

c. Le milieu MP + acide pantothénique est sans effet immédiat sur l'activité de la glycogène-synthétase.

Quel est le mode d'action du CoA dans cette action ?

Deux hypothèses peuvent être envisagées :

Il pourrait y avoir une synthèse augmentée du glycogène par un apport d'énergie résultant du maintien des oxydations cellulaires

Tableau XXXIII

INFLUENCE DU COENZYME A ET DE L'ACIDE PANTOTHENIQUE SUR L'ACTIVITE
ENZYMATIQUE DE L'HOMOGENAT FRAIS AU TEMPS T₀.

Essai	Enzyme + MP	Enzyme + MP + CoA		Enzyme+MP+aci- de pantothénique
	Activité enzymatique (I)	Activité enzymatique	Différence en % par rapport à (I)	Activité enzymatique
	µM	µM		µM
1	2,46	4,86	97,56	2,34
2	1,92	4,83	150,00	1,77
3	2,37	2,43	2,53	2,40
4	2,16	2,97	37,50	2,22
5	2,28	2,76	21,05	2,40
6	2,85	3,42	20,00	2,91
7	2,22	2,88	29,72	2,40

La composition du milieu d'incubation est réalisée suivant le schéma opératoire . Les quantités de CoA et d'acide pantothénique sont respectivement de 1 µg et 10 µg . L'activité de la glycogène-synthétase est exprimé en µM d'UDP par minute et par gramme de foie frais .

à un niveau élevé en présence de CoA.

Cette hypothèse a été avancée par ROBBINS et coll. en 1959, mais les auteurs eux-mêmes ont constaté que le CoA ne peut être remplacé " in vitro " par un composé comportant une liaison phosphate riche en énergie (ATP par exemple).

La deuxième hypothèse est plus complexe. Il y aurait activation de la réaction de synthèse par le CoA, elle serait due à son intervention directe sur la réaction enzymatique par interconversion des formes I et D de l'enzyme. Rappelons qu'APPLEMAN et coll. (5) considèrent que la présence d'ATP et d'ions Mg^{++} est indispensable à cette interconversion :



Un deuxième type d'action directe du CoA sur la réaction consisterait en l'activation ou du substrat UDPG ou de l'accepteur, le glycogène.

Quelque soit le mécanisme impliqué, nous avons montré que l'effet activateur du CoA ne peut se manifester qu'en présence du " milieu protecteur " qui contient de l'ATP. Ce dernier composé pourrait jouer un rôle multiple.

Dans des expériences de réalimentation par un régime hyperglucidique après une période de jeûne de 48 heures, CHANDLER et MOORE (18) n'ont pas trouvé de corrélation entre le niveau d'activité de la glycogène-synthétase dans le tissu adipeux et la quantité de glycogène déposé dans ce même tissu chez le rat. Le taux de glucose-6-phosphate du tissu n'a pas varié (0,06 μM par gramme de tissu) durant l'expérience. Au moment où le dépôt de glycogène était maximal dans le tissu adipeux, les teneurs des formes D ou I s'élèvent à 40 - 50 p. 100 de leur valeur avant le jeûne. Puisque les formes I et D variaient de façon parallèle, CHANDLER et MOORE suggéraient que la perte d'activité totale de la glycogène-synthétase sous l'action du jeûne, était due à une perte temporaire de protéine-enzyme, ou à la transformation

de l'une et l'autre forme en une troisième inactive, proposée par plusieurs auteurs (96). Dans ce cas, la réalimentation induirait la synthèse " de novo " de nouvelles molécules de protéine enzyme, ou réactiverait la forme intermédiaire inactive. Or, le rat à jeun mobilise ses graisses de réserve pour couvrir ses besoins énergétiques. Le CoA intervient dans la dégradation des acides gras et dès la réalimentation, il se trouve disponible en quantité plus grande et peut agir en augmentant le niveau d'activité de la glycogène synthétase. La mesure des variations de son niveau d'activité enzymatique sous l'influence du CoA est rendue difficile du fait de sa fragilité.

Cette influence fugace n'a pu être mesurée qu'en présence d'extrait d'enzyme brut et frais. Cet extrait brut lui-même devrait permettre de mesurer et l'activité réelle telle qu'elle existe dans le tissu - et l'activité potentielle obtenue en ajoutant les activateurs à l'extrait. Mais rapidement, avec le temps, l'extrait perd de son activité et de plus devient insensible aux activateurs ainsi qu'il ressort de nos courbes expérimentales de la figure 14. Les faits enregistrés montrent la persistance de l'activité de l'enzyme après 8 heures, alors que l'activation par le CoA a disparu dès la 2^e heure.

4 - Spécificité du substrat de la glycogène-synthétase : action du CoA sur cette spécificité

Dans cette série d'expériences, le substrat spécifique (UDPG) de la glycogène-synthétase est remplacé par d'autres nucléosides diphospho-glucose à savoir l'adénosine diphosphoglucose, le cytidine diphosphoglucose et le guanosine diphosphoglucose. Après incubation, la quantité de nucléosides diphosphoglucose utilisés par la glycogène synthétase dans la réaction de transfert de radical glucosyl est déterminée par des courbes d'étalon obtenues à partir des diphospho-nucléosides correspondants. Remarquons qu'elles ne se diffèrent pas,

Tableau XXXIV

ACTION DU COENZYME A SUR LA SPECIFICITE DU SUBSTRAT DE LA GLYCOGENE-SYNTHETASE .

Substrats	Activité de la glycogène-synthétase	
	Enzyme + MP	Enzyme + MP + CoA
UDPG	2,56	2,91
ADPG	0,43	0,23
	0,51	0,34
	0,51	0,28
CDPG	0,60	0,63
	0,54	0,54
	0,51	0,54
GDPG	0,46	0,29
	0,49	0,51
	0,56	0,50

MP = milieu protecteur

L'uridine diphosphoglucose (UDPG) est successivement remplacé par l'adénosine, la cytidine et la guanosine diphosphoglucose (ADPG, CDPG et GDPG) dans le milieu réactionnel . L'activité de la glycogène-synthétase est exprimée en μM de diphosphonucléoside par minute et par gramme de foie frais

car au niveau de la réaction catalysée par la pyruvate Kinase, l'accepteur (diphosphonucléosides) de la liaison phosphate riche en énergie du phosphoénolpyruvate (PEP) n'est pas strictement spécifique :



C'est surtout au niveau de la réaction de transfert du radical glucosyl qu'on observe une étroite spécificité de substrat pour l'UDPG de la glycogène-synthétase du foie de rat, comme l'indiquent nos résultats groupés dans le tableau XXXIV. Aucun substrat de remplacement ne permet à la glycogène-synthétase d'opérer en présence ou en absence du CoA, le transfert normal et rapide du radical glucosyl sur la chaîne de glycogène amorce.

L'affinité de la glycogène-synthétase pour l'UDPG en présence ou pas de CoA aurait, selon nous, une double signification concernant le rôle des bases puriques (adénine, guanosine) et pyrimidiques (uracile, cytosine) dans les métabolismes intermédiaires des glucides et des lipides.

a - La présence dans les cellules des composés riches en énergie tels que l'ATP, le GTP confirme qu'ils constitueraient pour l'organisme des réserves de l'énergie endogène, dont le rôle principal est d'activer les composés réactionnels.

b - Les bases pyrimidiques concourent surtout au transport des radicaux nécessaires à l'accomplissement de différentes synthèses : l'UDP spécifique de la synthèse des glucides tandis que le rôle des diphosphocytidines (tels que la diphosphocholine) interviendrait plutôt dans la synthèse des lipides.

En résumé, il y a activation de la glycogène-synthétase du foie de rat par le coenzyme A et ceci en présence de l'ATP. Cette activation par le coenzyme A ne modifie pas l'affinité de l'enzyme du foie de rat pour son substrat UDPG.

CONCLUSIONS

Ce mémoire concerne l'étude de l'influence de l'acide pantothénique sur l'absorption intestinale du glucose et son devenir après passage dans le sang mésentérique . Cette étude a nécessité en raison de la complexité du problème, l'utilisation de nombreuses techniques dont quelques unes originales : anses de Thiry-Vella simple et double, dosage en continu du glucose au niveau d'une veinule mésentérique chez le rat, nous ont permis de préciser le mode d'action de l'acide pantothénique sur l'absorption intestinale du glucose .

Action de l'acide pantothénique sur l'absorption intestinale du glucose .

Chez le rat normal, porteur d'une anse intestinale simple recevant un régime complet, notamment en ce qui concerne les vitamines B, nous avons observé l'augmentation importante de l'absorption du glucose si le perfusat est additionné d'acide pantothénique .

Cette activation est spécifique de l'acide pantothénique . D'autres vitamines hydrosolubles sont sans effet de même que la β -alanine et le panthénol, dérivé alcoylé de la vitamine . La présence du groupement carboxyle est donc nécessaire pour activer l'absorption du glucose .

L'acide pantothénique pénètre dans les entérocytes de façon passive avec une vitesse fonction de sa concentration intraluminal . L'activation a lieu "in situ" en sa présence, elle s'exerce à la face muqueuse de l'intestin (rats porteurs d'anse de Thiry-Vella double), elle est fugace .

L'hyperglycémie, due à la présence d'acide pantothénique dans le perfusat, mesurée au niveau d'une veinule mésentérique augmente de façon pratiquement immédiate .

Mécanisme d'action de l'acide pantothénique

Nos expériences permettent de dire que l'acide pantothénique intervient activement dans les mécanismes de transport du glucose . La saturation du système transporteur par l'acide pantothénique est décelée en enregistrant la glycémie en continu, on constate que le niveau maximal est atteint d'emblée .

La pantoyltaurine, antagoniste de l'acide pantothénique, inhibe l'action de cette vitamine sur le transport du glucose . Cette inhibition serait due à la fixation irréversible de la pantoyltaurine sur les sites actifs du complexe protéique transporteur du glucose .

A l'appui de cette hypothèse, nous avons pu mettre en évidence que l'actinomycine D n'affecte pas le niveau normal d'absorption du glucose mais elle abolit l'effet de l'acide pantothénique sur l'absorption ; or cet antibiotique inhibiteur de la synthèse protéique exerce une action sélective sur l'épithélium intestinal . Tout se passe comme si le facteur protéique sur lequel agit l'acide pantothénique était une protéine à renouvellement rapide .

Le dérivé biologique actif de l'acide pantothénique étant le coenzyme A, nous avons examiné l'influence de celui-ci sur l'absorption du glucose et mis en évidence que, sans action à faible dose, il diminue même l'absorption quand on utilise une dose plus élevée équivalente à celle présente sous forme d'acide pantothénique dans la paroi intestinale après perfusion . L'inhibition pourrait selon nous être due à la présence du groupement sulfhydryle car nous la retrouvons avec la cystéine et le glutathion pour les mêmes conditions expérimentales .

Nous avons analysé les teneurs en CoA et en acide pantothénique libre ou lié de la paroi intestinale et été conduit ici encore à la conclusion que l'acide pantothénique agirait spécifiquement sur l'absorption du glucose sous une forme autre que le CoA . L'acide pantothénique serait fixé sur les sites actifs d'une protéine responsable de l'activation du système transporteur du glucose - sites sensibles à la pantoyltaurine .

Influence de l'acide pantothénique et du CoA sur le sort du glucose après son absorption .

On constate que l'hyperglycémie au niveau de la veine jugulaire est très élevée après la perfusion en présence d'acide pantothénique, mais elle est faible et voisine de la normale en présence de CoA .

Nous avons montré que par rapport à la quantité de glycogène présente après une perfusion de glucose, l'adjonction de CoA dans le perfusat ne modifie pas la valeur du glycogène stocké . Il y a indépendance entre l'absorption du glucose, la glycémie et le stockage du glycogène, ces quantités ne varient pas dans le même sens . Par contre, l'étroite relation entre ces valeurs après adjonction d'acide pantothénique dans le perfusat, fait penser à l'existence d'une stimulation de l'activité de l'enzyme responsable de la synthèse du glucose .

Nous avons examiné l'influence de l'acide pantothénique et du CoA sur la synthèse "in vitro" de glycogène en présence de glycogène-synthétase et constaté que l'acide pantothénique n'active pas la glycogène-synthétase, par contre cette enzyme a une activité nettement plus grande en présence de CoA . Cette augmentation d'activité de la glycogène-synthétase nécessite d'une part la présence d'ATP et d'autre part, l'utilisation d'un extrait enzymatique fraîchement préparé . Par ailleurs, l'activation par le CoA ne modifie pas l'affinité de l'enzyme pour l'UDPG . Cette affinité est toujours très supérieure à celle manifestée à l'égard d'autres nucléosides diphosphoglucose (ADPG, GDPG, CDPG) . Il est très probable que le CoA en présence d'ATP sert de donneur intermédiaire du radical glucosyl et rend possible un mécanisme accéléré de mise en réserve du glucose .

BIBLIOGRAPHIE

- I - AKEDO, H., SUGAWA, T. YOSHKAWA, S. et SUDAM. (1960) J. Biochem. 47, 124.
- 2 - ALTHAUSEN, T.L., EILER, J.J. & STOCKHOLM, M. (1946) Gastroenterology 7, 469.
- 3 - ALVARADO, F. & CRANE, R.K. (1964). Biochim. Biophys. Acta, 93, 116.
- 4 - ANDERSON, J. (1970). Biochim. Biophys. Acta 208, 165.
- 5 - APPLEMAN, M.M., BELOCOPITOW, E. and TORRES, H.N. (1964). Biochem. Biophys. Res. Commun. 14, 550.
- 6 - ARNOULD, Y., BELLENS, R., CONARD, V., FRANCKSON, J.R.M. & MAINGUET, P. (1965), Metabolism 14, 166.
- 7 - AXELORD, A.E. & HOEPEL, S. (1960). J. Nutrit. 72, 325.
- 8 - BARANY, E. & SPERBER, E. (1939). Skand. Arch. Physiol. 81, 290.
- 9 - BARRY, R.J.C., DIKSTEIN, S., MATTHEWS, J., SMYTH, D.H. & WRIGHT, E.M. (1964). J. Physiol. (London) 171, 316.
- 10- BELOCOPITOW, E. (1961). Arch. Biochem. Biophys., 93, 457.
- 11- BERTALANFFY, F.D. (1960). Acta anat. 40, 130.
- 11bis- BLY, C.G, HEGGENESS, F. & NASSET, E.S. (1943) J. Nutr. 26, 161
- 12- BRAIN, M.C. & BOOTH, C.C. (1964). Gut. 5, 241
- 13- BUCHWALD, C.R. (1964). Proc. Soc. Exper. Biol. Med. U.S.A., 115 (3) 770.

- 14 - CAHILL, G.F., ASHMORE, J., ZOTTU, S. & HASTING, A.B. (1957). J. Biol. Chem., 244, 237.
- 15 - CASEY, M.G., FLEBERT, J.P. & VANNOTTI A. (1968). Digestion, I, 233.
- 16 - CAPRARO, V., BIANCHI, A. & LIPPE, C. (1963). Experientia, 19, 347.
- 17 - CHAN, S.S. & LOTSPEICH, W.D. (1962). Am. J. Physiol., 203, 975.
- 18 - CHANDLER, A.M. & MOORE, R.O. (1964). Arch. Biochem. Biophys. U.S.A. 108, 183.
- 19 - COHEN, L.L. & HUANG, K.C. (1964). Am. J. Physiol., 206, 647.
- 20 - COHEN, G.N. & MINZ, B. (1950). Arch. Sc. Physiol. 1950, 4, 145.
- 21 - CORI, C.F. (1925). J. Biol. Chem., 66, 691.
- 22 - CRANE, R.K. (1962). Feder. Proc. U.S.A., 21 (6), 891.
- 23 - CRANE, R.K. & KRANE, S.M. (1959). Biochim. Biophys. Acta, 31, 397.
- 24 - CRANE, R.K. & MANDELSTAM, P. (1960). Biochim. Biophys. Acta, 45, 460.
- 25 - CRANE, R.K., MILLER, D. & BIHLER, I. (1960-1961) - In " Proc. Membrane Transport Metabol. Prague 1960 ", London, New-York, Academic Press, 1961, 439.
- 26 - CRANE, R.K. & WILSON, T.H. (1958). J. Appl. Physiol., 12, 145.

- 27 - CSAKY, T.Z. (1961). Am. J. Physiol., 201, 999.
- 28 - CSAKY, T.Z. (1963). Feder. Proc., 22, 3.
- 29 - CSAKY, T.Z. & THALE, M. (1960). J. Physiol. (London) 151, 59.
- 30 - CSAKY, T.Z. & ZOLLICOFFER, L. (1960). Am. J. Physiol., 198, 1056.
- 31 - DARLINGTON, W.A. & QUASTEL, J.H. (1953). Arch. Biochem. 43, 194.
- 32 - DARMONTON, P. & WORBE, J.F. (1966). C.R. Soc. Biol. 1966, 160, 768.
- 33 - DE BOUCAUD, P., CASTAGNOU, R. & MANDILLON, G. (1960).
C.R. Soc. de Biol. Paris, 154 (12), 2253.
- 34 - DRABKIN, D.L. (1948). Proc. Am. Diabetes, A, 8, 171.
- 35 - DRELL, W. & DUMN, M.S. (1946). J. Am. Chem. Soc. 68, 1868.
- 36 - EILER, J.J., STOCKHOLM, M., & ALTHAUSEN, T.L. (1940).
J. Biol. Chem. 134, 283.
- 37 - ESPOSITO, G., FAELLI, A. & CAPRARO, V. (1964). Experientia, 20, 122
- 37^{bis} - FAUST, R.G. (1964) J. Cell. Comp. Physiol. 63, 119
- 38 - FIDANZA, A. & CONSTABLE, B.J. (1963), Acta Vitam. (Ital.) 17, 95.
- 38^{bis} - FISHER, R.B. & PARSONS, D.S. (1949) J. Physiol.(G.B.) 110, 36
- 39 - FRIDHANDER, L. & QUASTEL, J.H. (1955). Arch. Biochem. Biophys.
56, 424.
- 40 - GARNIER, L. & GOUDARD, L. (1960). J. Physiol. Fr., 52 (1)
- 41 - GIBSON, Q.H. & WISEMAN G. (1951). Biochem. J. 48, 426.
- 42 - GODEKEN, O.G.R., SANDRUS, R. & OLAVARRIA, J.M. (1966). Biochim.
Biophys. Acta 117, 255.

- 43 - HARTT, S.L. & NISSIM, J.A. (1964) . Nature, G. B., 204, 4953, 51
- 44 - HASSID, W.Z. & ABRAHAM, S. (1957). "Méthode in enzymology",
3,34, ed. Colowick and Kaplan, Newyork, Academic Press .
- 45 - HAWKINS, J.D. & WILLS, E.D. (1957) Biochim. BI0phys. Acta,
23, 210 .
- 45^{bis} - HEDON, M.E. (1900) C.R. Soc. Biol. 52, 87
- 46 - HESTRIN - LERNER, S. & SHARPIRO, B. (1954) Biochim. Biophys.
Acta 13, 54 .
- 47 - HIZUKURI, S. & LARNER, J. (1963), Biochim. Biophys. Acta,
73, 525.
- 48 - HINDMARSH, J. T. , KILBYD & WISEMAN, G. (1966) J. Physiol. Lond.
186, 166 .
- 49 - HILZ H. & LIPMANN F. (1955) Proc. Natl. Acad. Sc. 41, 880 .
- 50 - HOFFMAN, W. S. (1937) J. Biol. Chem. 120, 51 .
- 51 - IRVING, J. & SLOTNICK (1960) Ann. N.Y. Acad. Sc., 89, 342 .
- 52 - JACOBS, F. A. , COEN L.J. & HILLMAN (1960) J. Biol. Chem.
235, 1372 .
- 53 - JOHNSTON, J.M. (1958). Proc. Soc. Expertl. Biol. med., 98,
836-838 .
- 54 - JORGENSEN, Ch. R. , LANDAU, B.R. & WILSON, T.H. (1960).
Feder. Proc. 19, 130 .
- 55 - KABACK H.R. (1970) Ann. Rev. Biochem. 39, 561
- 56 - KAPLAN, N.O. & LIPMANN, F. (1948). J. Biol. Chem. 174, 37 .

- 57 - KEARNEY E.P. & SINGER T. P. (1953) Biochim. Biophys. Acta 11, 270 ; (1953) 11, 276 ; (1954) 14, 570
- 58 - KEPES A. (1964). In "the cellular functions of Membrane Transport" J.F. HOFFMAN Ed. Printice Hall 1964, 155.
- 59 - KESTON, A.S. (1954). Science 120, 355
- 60 - KING , T.E. & CHELDELIN, V.H. (1950) J. Bact. 59, 229
- 61 - KIYASU, J.Y. , KATZ J. & CHAIKOFF I. L. (1956) Biochim. Biophys. Acta, 21, 286
- 62 - KINTER, W.B. & WILSON, T.H. (1965) J. Cell Biol. U.S.A. 25 (2), 19-39
- 63 - KJERULF-JENSEN, K. (1942). Acta Physiol. Scand. 4, 225
- 64 - KOMAROV, S.A. , BRALOW, S.P. & BOYD, E. (1963) Proc. Soc. Exper. Biol. Med. U.S.A. , 112 (2), 451
- 65 - KORNFELD, E. & BROWN, D.H. (1962). The J. Biol. Chem., 237(6) 1772
- 66 - LARNER, J. (1964). Abstr. Intern. Congr. Biochem. N.Y. 9, 697
- 67 - LASZT, L. & SULLMAN (1935). Biochem. Ztschr., 278, 401 .
- 68 - LELOIR, L.F. & CARDINI, C.E. (1957). J. Am. Chem. Soc. 79, 6340
- 69 - LELOIR, L.F. , OLAVARRIA, J.M., GOLDBERG, S.H. & CARMINATTI, H. (1959). Arch. Biochem. Biophys. 81, 508
- 70 - LELOIR, L.F. & GOLDBERG, S.H. (1962). "Methods in Enzymology" Academic Press, New-York et London, vol V, 145 .
- 71 - LE VAN HUNG (1964)^a. Ann. Nutrit. Alim. Fr., 18, 59

- 72 - LE VAN HUNG (1964).C.R. Acad. Sc. Paris, 259, 1783
- 73 - LLUCH. M. & PONZ. F. (1963), Rev. Espan, Fisiol. 19, 187
- 74 - Mc ILWAIN H. & HAWKING F. (1943).Lancet, 1 , 449
- 75 - Mc ILWAIN H. & HUGHES D.E. (1945).Biochem. J. 39 , 133
- 76 - MARNAY, C. (1953). Bull. Soc. Chem. Biol. 35 , 220
- 77 - MATTHEWS, J. & SMYTH, D.H. (1960).J. Physiol. G.B. 154, (2)
63 P, 64 T.
- 78 - NAGASAWA, S. (1957). J. Biochem. 49, 399
- 79 - NATHANS, D. (1964). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 51, 585
- 80 - NEWHEY, H. PARSONS, B.J. & SMYTH, D.H. (1959).
J. Physiol. (London), 148, 83
- 81 - NEWHEY, H. & SMYTH, D.H. (1964). Nature 202, 400-401
- 82 - NICHOLSON, J.T. & CHORNOCK, F.W. (1942).
J. Clin. Invest. 21 , 505
- 83 - NISHI, H., KING, T.E. & CHELDELIN, V.H. (1950).
J. Nutrit. 41, 279
- 84 - NISSIM, J.A. (1960). Nature 187 , 308
- 85 - NORMAN, A.W. (1965). Science 149, 185
- 86 - PARSONS, B.J. , SMYTH, D.H. & TAYLO, C.B. (1958).
J. Physiol. 144, 387
- 87 - PASCAUD, M. (1970). G.L.N. Bull. n° 2 Avril 1970, 1

- 88 - PFALTZ, H. (1943). Z. Vitaminforsch. 13, 236.
- 89 - PHILIPS, F.S., SCHWARTZ, H.S., STERNBERG, S.S. & TAN, C.T.C. (1960)
Ann. N.Y. Acad. Sc. 89, 348.
- 90 - QUASTEL, J.H. (1964). In "Proc. 6th Intern. Congr. Nutrit.
Edinburgh 1963", London, Livingstone Ltd. 1964, 342.
- 91 - REICH, E. FRANKLIN, R.M., SHATKIN, A.J. & TATUM, E.L. (1962).
Proc. Natl. Acad. Sc. U.S. 48, 1238.
- 92 - RICKLIS, E. & QUASTEL, J.H. (1958).
Can. J. Biochem. and Physiol. 36, 347.
- 93 - RICKLIS, E. & QUASTEL, J.H. (1961).
Can. J. Biochem. and Physiol. 36, 281.
- 94 - ROBINS, P.W., TRAUT, R.B. & LIPMANN, F. (1959).
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 45, 6.
- 95 - ROBBINS, P.W. & LIPMANN, F. (1959).
"Regulation of Cell Metabolism" Ciba Foundation, 188.
- 95^{bis} - ROSS, G., WHITE, F.N., BROWN, A. & KOLIN, A. (1966) J. Appl. Physiol., 21, 1273.
- 96 - ROSSELL-PEREZ, M. & LARNER, J. (1964a). Biochemistry, 3, 81.
- 97 - ROSSELL-PEREZ, M. & LARNER, J. (1964b). Biochemistry, 3, 773.
- 98 - ROZEN, R. (1969). Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys. 9, 435.
- 99 - SCHMID, R., ROBBINS, P.W. & TRAUT, R.P. (1959).
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 45, 1236.
- 100 - SCHULTZ, S.G. & ZALUSKY, R. (1963).
Physiol. Bohemoslovenica. 12, (2), 112.

- 101 - SCHULTZ, S.G. & ZALUSKY, R. (1964). J. Gen. Physiol. 47 , 1043
- 102 - SKEGGS, H.R. & WRIGHT, L.D. (1944). J. Biol. Chem. 156, 21.
- 103 - SNELL, E.E. (1941). J. Biol. Chem. 139, 975 ; 141, 121.
- 104 - SOLS, A. & PONZ, F. (1947). Rev. Espan. Fisiol. 3 , 207.
- 105 - SOLS, A. (1956). Biochim. Biophys. Acta, 19, 144.
- 106 - SOVIK, O. ; OYE, I. & ROSELL-PEREZ, M. (1966).
Biochim. Biophys. Acta 124, 23.
- 107 - SPENCER, R.P., PURDY, S., HOELDTLKE, R., BOW, T.M. &
MARKULIS, M.A. (1963). Gastroentero Logy, 44, 768.
- 108 - SPENCER, R.P. & BOW, T.M. (1964). J. Nucl. Med, 5 , 251.
- 109 - SUTHERLAND, E.W. & CORI, C.F. (1951). J. Biol. Chem., 188, 531.
- 110 - SZORADY, I., VICSAY, M., OBAL, F., PUSZTAI, R. & TOTH, J. (1962).
Ann. Med. Exper. Biol. Fenniae, 3 , 326.
- 111 - TAYLOR, W.R. & LANGDON, R.G. (1956). Biochim. Biophys. Acta,
21, 384.
- 112 - TAYLOR, A.N. & WASSERMAN, R.H. (1967). Arch. Biochem. Biophys.
119, 536.
- 113 - TERROINE, T. (1955). Ann. Nutr. Alim. 2 , 361.
- 114 - TERROINE, T. (1959). Arch. Sc. Physiol. 13 , 483.
- 115 - THIRY, M. (1864). Akad. Wien. Math. Natur. KI. I., 50, 77.

- 116 - TURNER, J.B. & HUGHES, D.E. (1962). Q. Jl. Exp. Physiol. 47, 107.
- 117 - UNNA, K. & GRESLIN, J.G. (1940). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 45, 311.
- 118 - UNNA, K. & GRESLIN, J.G. (1941). J. Pharm. 73, 85.
- 119 - VELLA, L. (1888). Naturl. Mensch. u. Thiere, 13, 40.
- 120 - VERZAR, F. & Mc GOUGALL, E.J. (1936). "Absorption from the intestine" London, Longmans, Green and Co.
- 121 - VIDAL-SIVILLA, S., SOLS, A. & PONZ, F. (1950).
Rev. Espan. Fisiol. 6, 195.
- 122 - VIDAL-SIVILLA, S. (1952). Rev. Espan. Fisiol. 8, 269.
- 123 - VILLAR-PALASI, C. & LARNER, J. (1960a).
Biochim. Biophys. Acta, 39, 171.
- 124 - VILLAR-PALASI, C. & LARNER, J. (1960b).
Arch. Biochim. Biophys. 86, 270.
- 125 - WASSERMAN, R.H., & TAYLOR, A.N. (1966). Science, 195, 791.
- 126 - WASSERMAN, R.H., CORRADINO, R.A. & TAYLOR, A.N. (1969).
J. Gen. Physiol. 54, 114 s.
- 127 - WEISER, M.M. & ISSELBACHER, K.J. (1969). Feder, Proc. 28, 463.
- 128 - WILBRANDT, W. & LASZT, L. (1933). Biochem. Ztschr. 267, 204.
- 129 - WILSON, T.H. & CRANE, R.K. (1958). Biochim. Biophys. Acta, 29, 30.
- 130 - WILSON, T.H. & LANDEAU, B.R. (1960). Am. J. Physiol. 198, 99.

- 116 - TURNER, J.B. & HUGHES, D.E. (1962). Q. Jl. Exp. Physiol. 47, 107.
- 117 - UNNA, K. & GRESLIN, J.G. (1940). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 45, 311.
- 118 - UNNA, K. & GRESLIN, J.G. (1941). J. Pharm. 73, 85.
- 119 - VELLA, L. (1888). Naturl. Mensch. u. Thiere, 13, 40.
- 120 - VERZAR, F. & Mc GOUGALL, E.J. (1936). "Absorption from the intestine" London, Longmans, Green and Co.
- 121 - VIDAL-SIVILLA, S., SOLS, A. & PONZ, F. (1950). Rev. Espan. Fisiol. 6, 195.
- 122 - VIDAL-SIVILLA, S. (1952). Rev. Espan. Fisiol. 8, 269.
- 123 - VILLAR-PALASI, C. & LARNER, J. (1960a). Biochim. Biophys. Acta, 39, 171.
- 124 - VILLAR-PALASI, C. & LARNER, J. (1960b). Arch. Biochim. Biophys. 86, 270.
- 125 - WASSERMAN, R.H., & TAYLOR, A.N. (1966). Science, 195, 791.
- 126 - WASSERMAN, R.H., CORRADINO, R.A. & TAYLOR, A.N. (1969). J. Gen. Physiol. 54, 114 s.
- 127 - WEISER, M.M. & ISSELBACHER, K.J. (1969). Feder, Proc. 28, 463.
- 128 - WILBRANDT, W. & LASZT, L. (1933). Biochem. Ztschr. 267, 204.
- 129 - WILSON, T.H. & CRANE, R.K. (1958). Biochim. Biophys. Acta, 22, 3.
- 130 - WILSON, T.H. & LANDEAU, B.R. (1960). Am. J. Physiol. 198, 99.

- 131 - WILSON, T.H. & WISEMAN, G. (1954). J. Phys. 123, 126.
- 132 - WINKLER, H.H. & WILSON, T.H. (1967). Biochim. Biophys. Acta 135 , 1030.
- 133- WISEMAN, G. (1953). J. Physiol. 120, 63.; (1957). 136, 203.
- 134 - ZULL, J.E. , CZARNOWSKA-MISZAL, E. & De LUCA, H.F. (1965).
Science, 149, 182.
- 135 - ZULL, J.E. , CZARNOWSKA-MISZAL, E. & De LUCA, H.F. (1966).
Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A., 55, 177.

LEXIQUE D'ABREVIATIONS

ADP	: Adénosine diphosphate
ADPG	: Adénosine diphosphoglucose
AP	: Acide pantothénique
ATP	: Adénosine triphosphate
CDP	: Cytidine diphosphate
CDPG	: Cytidine diphosphoglucose
CoA	: Coenzyme A
EDTA	: Ethylène diamine tétraacétate
GDP	: Guanosine diphosphate
GDPG	: Guanosine diphosphoglucose
GTP	: Guanosine triphosphate
MP	: Milieu protecteur
PEP	: Phosphoenolpyruvate
UDP	: Uridine diphosphate
UDPG	: Uridine diphosphoglucose .

=====

Académie de Paris
UNIVERSITE de PARIS VI
11, Quai Saint Bernard - Paris 5

PERMIS D'IMPRIMER

Vu et Approuvé
Paris, le 14 Mai 1971
Le Président
de l'Université de Paris VI
A. HERPIN

